

THESE

**Présentée
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**Ecole doctorale : Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et
bioingénieries**

Spécialité : Filière « Qualité et sécurité des aliments »

**par
Pierre Ferré**

Etude des lésions musculaires iatrogènes : Méthodes non invasives d'évaluation quantitative et mécanismes physiopathologiques

soutenue le 5 novembre 2004 devant le jury composé de :

M TOUTAIN	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Président
M LEFEBVRE	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Directeur de thèse
M LAURENTIE	<i>Docteur d'Université</i>	Rapporteur
M SALVAYRE	<i>Professeur d'Université</i>	Rapporteur
Mme LIAUBET	<i>Docteur d'Université</i>	Membre
M BRAUN	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Membre

N° d'ordre :

THESE

**Présentée
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**Ecole doctorale : Sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et
bioingénieries**

Spécialité : Filière « Qualité et sécurité des aliments »

**par
Pierre Ferré**

Etude des lésions musculaires iatrogènes : Méthodes non invasives d'évaluation quantitative et mécanismes physiopathologiques

soutenue le 5 novembre 2004 devant le jury composé de :

M TOUTAIN	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Président
M LEFEBVRE	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Directeur de thèse
M LAURENTIE	<i>Docteur d'Université</i>	Rapporteur
M SALVAYRE	<i>Professeur d'Université</i>	Rapporteur
Mme LIAUBET	<i>Docteur d'Université</i>	Membre
M BRAUN	<i>Professeur ENV Toulouse</i>	Membre

A notre jury de thèse qui nous a fait l'honneur de juger ce travail, hommage respectueux.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Pierre-Louis Toutain qui nous a accueilli au sein de son laboratoire et, par son intégrité, son dynamisme et ses précieux enseignements, notamment dans le cadre de l' « European Training in Veterinary Pharmacology and Toxicology », nous a initié à la pharmacocinétique et permis d'acquérir les principes de la recherche expérimentale. Qu'il soit assuré ici de notre plus respectueuse considération.

Nous adressons tout particulièrement nos remerciements à Monsieur le Professeur Hervé Lefebvre, qui nous a accueilli comme doctorant, nous a aidé et sans cesse guidé tout au long de ces années de thèse avec rigueur, optimisme et enthousiasme. Qu'il soit assuré de notre sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur Laurence Liaubet, pour nous avoir guidé avec clairvoyance et sympathie dans nos travaux de génomique fonctionnelle. Ce fut une expérience très enrichissante. Sincères remerciements.

A Messieurs les Professeurs Robert Salvayre et Jean-Pierre Braun, et à Monsieur le Docteur Michel Laurentie, pour avoir accepté de lire ce travail et de participer à notre jury. Sincères remerciements.

A Alain Bousquet-Melou, merci Alain pour tes enseignements, tes judicieux conseils et nos fréquentes discussions à propos des concepts pharmacocinétiques.

A Véronique Dupouy, merci Véronique d'avoir permis l'élargissement du champ de ma thèse grâce à tes compétences en biologie moléculaire ... et en assurance qualité !

An Eckart Thein, von München, vielen Dank für die Hilfe mit den Kaninschen und den « Fluorescent microspheres » !

Merci aux équipes d'Anatomie Pathologique de l'hôpital Rangueil et de l'école vétérinaire de Toulouse.

Merci à la « Dream Team » de la biostatistique de l'UMR 181 : Didier Concordet, Faouzi Lyazrhi, Djelil Chafaï et Pascal Bourdaud'hui, pour les discussions passionnées et les conseils éclairés. Un merci tout particulier à Didier pour son aide, sa disponibilité, son écoute et ses encouragements constants « qui donnent des ailes! ».

Un grand merci à toute l'équipe de bioanalyse de l'UMR 181, pour leur contribution essentielle à ce travail : Valérie Laroute (Merci Valérie de m'avoir initié aux joies de « l'HPLC »), Nathalie Arpaillange, Gisèles Coste, Virginie Gascioli, et Nadine Gautier (Merci aussi Nadine pour ton aide à Auzeville !).

Je tiens également à remercier toute l'équipe zootechnique de l'UMR 181: Jean-Pierre Gau pour le soutien technique et chirurgical sans faille, puis Jean-Pierre Ferré, Jean Denjean, Joseph Maligoy et Patrice Rouby.

Merci à Véronique Gayrard, Nicole Hagen et Catherine Viguié, pour votre enthousiasme et votre bonne humeur souvent contagieuse.

Merci à Valérie Defforge, Simone Baures (merci Simone d'être si fréquemment revenue de la bibliothèque les bras chargés d'ouvrages !), et Jean-Paul

Serthelon (merci beaucoup Jean-Paul pour toute la gestion du matériel de l'UMR 181)

Merci à Jéroshalaim et à Cé-Laine, mes deux camarades de thèse, pour les discussions animées, et pour tous les excellents moments passés ensemble, à Toulouse et ailleurs (...).

Merci pour leur aide et leur sympathie à tous mes camarades étudiants qui ont fait un séjour au laboratoire pendant mes années de thèse : Guillaume, Nadège, Enrique, Elisabeth et Estève.

Je tiens à remercier également Philippe Mulsant pour l'accueil qu'il m'a réservé dans l'Unité 444 de Génétique Cellulaire à l'INRA d'Auzeville-Tolosane, pour la dernière partie de mon travail expérimental.

Merci à François Hatey, directeur du groupe de « Génétique et Différenciation Ovarienne », et à tous les membres de l'équipe : Francis Benne et Cécile Tonon pour la plateforme technique du génopole (Merci Francis pour ton habileté technique, une petite phrase d'occitan est souvent parvenue à dompter les robots ou appareils les plus capricieux), Agnès Bonnet (Agnès, ô reine de l'ARN et de ses mystères), Jeanine Raillères (Jeanine, prêtresse du grand gel de migration) Gwenola Tosser-Klopp, et les autres.

Merci également à tous les joyeux membres de l'Unité 444 pour leur sympathie et leur chaleureux accueil. Mentions spéciales pour Castor, Christelle, Eddie, Fred, Julie, Nadine, Olivier et Thomas.

A tous ceux qui me sont proches et chers,

Frédérique,

Anne-Thérèse,

mes parents et grand-parents,

pour leur soutien toujours renouvelé.

Résumé

La voie intramusculaire (IM) est très largement utilisée en médecine humaine et vétérinaire pour l'administration de formulations pharmaceutiques. Malgré de nombreux avantages, l'administration IM entraîne fréquemment le développement de lésions au site d'injection (lésions iatrogènes). Les lésions peuvent occasionner des douleurs et des conséquences cliniques graves. Elles sont aussi responsables de pertes économiques chez l'animal de rente par la saisie des pièces de viande concernées, l'altération des qualités organoleptiques de la viande et la présence locale de résidus de principe actif.

- Le premier objectif de ce travail était de tester deux approches d'évaluation quantitative des lésions en les comparant au volume mesuré du muscle détruit. Ainsi, les qualités métrologiques de l'échographie sont acceptables pour la mesure des muscles sains, mais la technique ne permet pas de détecter et quantifier précisément les lésions musculaires. Une méthode développée auparavant, basée sur l'analyse pharmacocinétique de la créatine kinase plasmatique a été validée ici, puis appliquée au calcul de la quantité de muscle détruit lors d'injections de différents volumes d'une même formulation. Ainsi, cette technique peut être avantageusement utilisée par les industriels du médicament pour aider au développement de nouvelles formulations.

- Dans un deuxième temps, l'exploration des mécanismes physiopathologiques du développement des lésions a été menée chez plusieurs modèles animaux en fonction des outils disponibles. Nous avons montré chez l'ovine une évolution biphasique de la température du site d'injection, avec une hypothermie transitoire suivie d'une hyperthermie durable, évoquant une ischémie-reperfusion. Ainsi, une ischémie-reperfusion musculaire expérimentale chez le rat a permis l'étude de l'activation des composantes inflammatoires cyclooxygénases 1 et 2.

Dans un modèle de lésion induite par le propylène glycol chez le lapin, des contractions musculaires fugaces ont été observées au moment de l'administration. L'étude des débits sanguins locaux par la technique des microsphères a montré une hétérogénéité spatiale, avec une zone centrale hypoperfusée entourée d'une zone à forte hyperhémie transitoire : l'hyperhémie et les contractions musculaires ne sont pas responsables de la lésion, mais l'inflammation neurogénique, les prostanoïdes issus de l'acide arachidonique et le calcium intracellulaire sont impliqués.

Enfin, l'étude du transcriptome par l'utilisation d'un microréseau porteur de 3456 séquences d'ADNc représentant 1908 gènes connus a permis d'identifier 187 gènes dont l'expression est modifiée à 6h, 2, 7 ou 21 jours après une administration IM de propylène glycol chez le porc.

**Etude des lésions musculaires iatrogènes :
Méthodes non invasives d'évaluation quantitative
et mécanismes physiopathologiques**

SOMMAIRE

INTRODUCTION	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. LES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES : ETAT DES LIEUX	14
A. GENERALITES	14
B. FACTEURS LESIONNELS IDENTIFIES	41
II. METHODES D'EVALUATION DES LESIONS	51
A. METHODE ANATOMO-PATHOLOGIQUE	52
B. IMAGERIE MEDICALE	54
C. EVALUATION DES LESIONS MUSCULAIRES PAR DES MARQUEURS CIRCULANTS	55
III. ASPECTS MECANISTIQUES DU DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	61
A. DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	61
B. METHODES EXPERIMENTALES	78
ETUDE EXPERIMENTALE	87
OBJECTIFS	87
I. DETECTION ET EVALUATION QUANTITATIVE DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	87
A. ETUDE 1 - VALIDATION DES METHODES DE QUANTIFICATION DES LESIONS (ARTICLE 1)	88
B. ETUDE 2 - APPLICATION ET CONSEQUENCE PHARMACOCINETIQUE (ARTICLE 2)	112
C. DISCUSSION GENERALE	139
II. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES D'ORIGINE IATROGENE	143
MODELE EXPERIMENTAL	143
A. ETUDE DE L'INFLAMMATION MUSCULAIRE : VOIE DES CYCLOOXYGENASES	143
B. ETUDE DES DEBITS SANGUINS MUSCULAIRES	169
C. ETUDE DU TRANSCRIPTOME MUSCULAIRE (ARTICLE 5)	183
D. DISCUSSION GENERALE	206
CONCLUSION	210

INTRODUCTION

L'administration de molécules par voie intramusculaire (IM) est très largement pratiquée en thérapeutique vétérinaire et en médecine humaine.

L'IM offre de nombreux avantages: Les administrations sont faciles à réaliser et il est possible de contrôler précisément la dose administrée. La vitesse d'absorption systémique des principes actifs est modulable. En effet, il existe des formes pharmaceutiques à effet rapide ou à effet prolongé, formulations dites « retard » pour lesquelles le produit est libéré lentement à partir du site d'injection. De plus, la voie IM permet l'usage de molécules qui sont de plus en plus développées en médicaments et ne peuvent pas être administrées par d'autres voies, comme les peptides, les protéines, ou les systèmes d'implantation de gènes (Brazeau *et al.*, 1998). Cependant, la voie IM présente un inconvénient majeur lié au développement de lésions locales au site d'injection (lésions dites « iatrogènes »). Ces lésions peuvent occasionner des douleurs plus ou moins persistantes ou sévères, et des effets indésirables marqués : de nombreux cas de pertes fonctionnelles sont rapportés suite à des contractures musculaires ou des atteintes nerveuses dues à des administrations de médicaments. Aussi, de nombreux progrès restent à faire pour améliorer la tolérance locale des formulations, notamment dans les traitements au long cours (antibioprophylaxie, antibiothérapie, administration de psychotropes, etc...).

Chez l'homme, une étude rétrospective a montré que 46 % des patients hospitalisés reçoivent au moins une injection intramusculaire (IM) (Greenblatt et Allen, 1978). Un grand nombre de formulations à usage intramusculaire sont aujourd'hui encore très irritantes. L'administration IM, l'un des actes de base les plus fréquemment réalisés en soins infirmiers, bénéficie pourtant de très peu de support théorique (Beecroft et Redick, 1990).

Chez l'animal de rente, l'injection IM est la voie d'administration la plus utilisée. Outre les risques médicaux individuels, la lésion entraîne des pertes économiques majeures par saisie des sites d'administration lors de l'abattage et/ou de la découpe des animaux. La lésion altère également la palatabilité de la viande. Ainsi, les pertes totales ont été estimées pour l'année 1995 à 200 millions de dollars aux Etats-Unis

(George *et al.*, 1997). De plus, 70.8 millions de repas sont affectés chaque année par la présence de morceaux de bœuf à palatabilité altérée par un parage inadéquat des lésions au site d'injection (George *et al.*, 1997). Il peut également persister des résidus de principe actif au site d'administration, ce qui représente un danger potentiel pour le consommateur de denrées d'origine animale (Rasmussen et Svendsen, 1976).

D'après Brazeau et col., lors du développement galénique d'une formulation, les principales propriétés qui sont optimisées sont en général la solubilité et la stabilité, et la tolérance locale en second plan seulement (Brazeau *et al.*, 1998). Pourtant, en développement préclinique de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'évaluer précocement la tolérance locale des formulations injectables chez les animaux de laboratoire, pour ne choisir que les formulations les mieux tolérées. Il faut aussi évaluer les réactions locales chez les espèces cibles avant la mise sur le marché pour garantir la bonne tolérance des formulations finales. Actuellement, les études de tolérance sont essentiellement réalisées *in vivo* en utilisant des méthodes anatomopathologiques. Ces études sont pratiquées sur des lots d'animaux après euthanasie à différents intervalles de temps après administration. Ce sont des études observationnelles *sensu stricto* de la tolérance locale. Une méthode alternative permettant l'évaluation non invasive et quantitative des lésions musculaires a été développée précédemment. Cette méthode est basée sur la libération d'une enzyme musculaire dans le secteur extracellulaire et plasmatique lors de souffrance cellulaire. L'activité de cette enzyme, la créatine kinase (CK), est facilement dosable dans le plasma, et ses paramètres pharmacocinétiques ont ainsi été largement décrits chez différentes espèces animales (Lefebvre HP, 1994). Des équations générales ont été proposées pour obtenir une évaluation de la quantité totale de muscle atteint lors d'une administration intramusculaire à partir des profils d'activité plasmatique en CK observés après l'administration. Néanmoins, cette méthode indirecte n'avait pas été validée par comparaison avec la masse « vraie » de muscle atteint.

L'objectif de la première partie de notre travail expérimental a donc été de valider cette approche pharmacocinétique non invasive par comparaison avec la quantité réelle de muscle lésé, mesurée après prélèvement des muscles. La méthode a été appliquée à l'évaluation des lésions musculaires suite à l'administration de volumes

croissants d'une formulation irritante de phénylbutazone. Nous avons pu ainsi appréhender les conséquences pharmacocinétiques de l'étendue des lésions sur le phénomène d'absorption du principe actif depuis le site d'administration. Nous avons également tenté de proposer une méthode non invasive d'imagerie médicale par échographie, technique qui permet de suivre régulièrement, en temps réel le développement des lésions musculaires.

Le deuxième volet de notre travail expérimental, plus fondamental, était d'explorer les mécanismes du développement des lésions musculaires pour parvenir à améliorer la tolérance des formulations ou de mieux comprendre la régénération du muscle après lésion. Ainsi, l'observation d'une évolution biphasique de la température cutanée en surface du point d'injection nous a amené à formuler l'hypothèse de l'intervention d'un phénomène de type « ischémie-reperfusion » au site d'injection par homologie avec le syndrome des « loges musculaires » observé chez certains sportifs, ou par rapprochement avec l'infarctus du myocarde. Une étude des débits sanguins du muscle après une administration IM a été ainsi réalisée chez le lapin en phase aiguë avec ou sans l'utilisation d'agents modulateurs pharmacologiques. Une étude des phénomènes inflammatoires associés aux lésions et aux perturbations de débits sanguins a été mise en place également chez le rat avec une « ischémie-reperfusion » musculaire expérimentale. Les cyclooxygénases 1 et 2, enzymes clé de l'inflammation, et cibles pharmacologiques de l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été recherchées à différents temps au cours de la reperfusion du muscle.

Enfin, une étude de génomique fonctionnelle a été menée par l'analyse de l'évolution du transcriptome musculaire chez le porc à différents stades de lésion musculaire induite par une administration IM de PG.

Ce document s'articule en deux parties principales :

- Une synthèse bibliographique autour des lésions musculaires iatrogènes, leur évaluation, les principaux facteurs lésionnels identifiés et des éléments de physiopathologie
- Une partie expérimentale rassemblant les principaux résultats et discussion sous forme d'articles originaux

Première partie :

Synthèse bibliographique

I. Les lésions musculaires iatrogènes : état des lieux

A. Généralités

1. Problématique : Les voies d'administration des médicaments

Plusieurs voies d'administration sont possibles pour les médicaments. Les plus utilisées sont les voies orales et parentérales classiques (il s'agit des voies intramusculaires, sous-cutanées, intravasculaires). Il est rapporté que l'injection intraveineuse a été inventée par Major en 1662, l'injection sous-cutanée par l'écossais Alexander Wood en 1853 pour traiter localement une névralgie à la morphine, et enfin l'injection intramusculaire par le français Alfred Luton en 1882 (Oshida *et al.*, 1979; Svendsen O, 1988).

a) La voie orale

En général, chez l'homme, c'est la voie la plus utilisée et la plus simple pour l'administration de médicaments. Elle a cependant un certain nombre de limites :

- Tous les principes actifs ne peuvent pas être administrés par voie orale, car certains sont détruits par la flore ou les sécrétions digestives. De plus, les principes actifs administrés doivent avoir des propriétés physicochimiques compatibles avec les processus d'absorption par les muqueuses digestives.
- Souvent, la biodisponibilité des principes actifs par voie orale est faible, avec des variations importantes interindividuelles, ce qui peut entraîner des différences importantes d'exposition des individus.
- Après absorption digestive, les principes actifs passent par la veine porte hépatique, et sont alors soumis à une métabolisation par le foie alors qu'ils n'ont pas encore atteint la circulation systémique. C'est l'effet de premier passage, qui peut limiter encore la biodisponibilité par voie orale.

Chez l'animal, la voie orale est *a priori* simple d'utilisation quand la substance à administrer peut être mélangée à l'eau de boisson ou à l'alimentation. Elle permet alors de traiter facilement l'ensemble des animaux de production pour lesquels la distribution est collective (porcs, volailles). En plus des limites citées pour la voie orale en général, la distribution orale collective souffre de nombreux inconvénients:

- Tous les animaux de l'effectif seront traités, indépendamment de leur statut malade ou sain
- Les quantités nécessaires de principe actif sont importantes puisqu'il y a toujours gaspillage d'eau ou d'aliment en élevage, et que les molécules seront plus longtemps soumises à d'éventuelles dégradations par la lumière ou la chaleur.
- La prise alimentaire ou l'abreuvement sont très variables entre les individus, et les écarts sont encore plus importants lorsque cohabitent des animaux sains et des malades (souvent apathiques et anorexiques). Ces derniers auront une prise médicamenteuse trop faible. Cette variabilité s'ajoute aux variations importantes de biodisponibilité interindividuelles liées aux différences d'absorption et de premier passage hépatique.

Chez l'animal, l'administration individuelle par voie orale est impossible à réaliser dans de grands effectifs, ou difficile techniquement (difficultés de contention, difficultés de gavage...)

b) Les voies parentérales injectables classiques (IM, SC, IV)

La voie parentérale offre plusieurs avantages :

- Elle permet l'emploi de molécules non utilisables par voie orale lorsqu'elles sont dégradées par la flore ou la digestion (vaccins, peptides, protéines,...)
- Elle permet un contrôle précis de la dose administrée et donc un respect optimal de la posologie. La biodisponibilité absolue pour les voies IM et SC est souvent très importante, proche de 100 %.
- Chez l'animal, au sein d'un troupeau, elle permet de traiter sélectivement les animaux malades quand il leur nombre est faible.

Parmi les voies injectables, chaque modalité présente des avantages et des inconvénients :

A/ Pour l'administration intraveineuse, les principaux avantages sont :

- L'action immédiate par l'obtention de concentrations plasmatiques élevées d'emblée.
- Une biodisponibilité totale (par définition) et un contrôle très précis de la dose administrée
- La possibilité d'administrer de grands volumes ou de maintenir des concentrations constantes par perfusion

Par contre, ses inconvénients sont :

- La nécessité d'une certaine technicité de l'opérateur, et d'une très bonne contention chez l'animal
- L'impossibilité de moduler la durée de l'action des principes actifs
- La nécessité de garantir l'apyrogénicité des solutions et la désinfection chirurgicale du site d'injection
- Le risque d'infection et/ou de phlébites associés aux cathétérismes veineux
- La nécessité d'une structure hospitalière pour la mise en œuvre des perfusions intraveineuses lorsque celles-ci sont nécessaires au long cours.

B/ La sous-cutanée et l'intramusculaire sont souvent comparées. Ces modes d'administration ont des avantages communs face aux autres modalités :

- Leur facilité de réalisation et la relative simplicité de la contention à assurer chez l'animal par rapport aux voies IV et orale
- Le traitement à domicile est facilité par rapport à l'administration par voie IV
- Il est possible de moduler la durée de l'action des principes actifs en utilisant des formes à libération prolongée.

Leurs inconvénients principaux sont les suivants :

- Il y a des risques de contamination septique des tissus si l'hygiène est négligée
- Une douleur plus ou moins persistante peut survenir au moment de l'administration

- L'aiguille peut se briser pendant l'injection suite aux mouvements de l'animal, et rester dans le tissu
- Une réaction locale et des lésions au point d'injection sont fréquemment observées
- Une persistance de résidus de principes actifs est possible au site d'injection

Les réactions tissulaires du muscle suite aux administrations IM sont problématiques chez les animaux de production dont la viande est consommée, car cette dernière perd alors une partie de ses qualités organoleptiques et peut contenir des résidus de principes actifs. Dans ce cas, la voie SC a été proposée pour remplacer le plus possible la voie IM. Cependant, des lésions étendues en superficie du muscle sont quand même observées lors d'administration SC. De plus, l'efficacité n'est pas toujours optimale par rapport à la voie IM car le tissu sous-cutané est moins vascularisé que le muscle, et il contient fréquemment une couche adipeuse qui retarde l'absorption. Ainsi, chez le porc, la voie IM est la seule possible actuellement pour l'administration de vaccins, ce qui assure une exposition efficace de l'antigène au système immunitaire (Povey et Carman, 1997).

2. Aspects économiques

a) Amérique du Nord

Vers la fin des années 1980, l'association américaine des éleveurs de bovins (National Cattlemen's Association) a été sensibilisée par les industriels de la viande (ateliers de découpe et d'emballage principalement), inquiets devant l'augmentation très importante des pertes liées aux parages et à l'élimination de morceaux inutilisables de plus en plus volumineux de viande bovine. Les industriels de la filière ont rapidement pris ce problème très au sérieux, et des programmes de recherche ont été initiés pour évaluer la cause de ces défauts de la viande et leur importance économique réelle. Une équipe de l'Université du Colorado (Colorado State University) est l'auteur de nombreux travaux, avec un programme financé par la « National Cattlemen's Beef Association ». Des enquêtes nationales ont été menées régulièrement, par la National Cattlemen's Beef Association avec la Colorado State

University, la Oklahoma State University, Texas and West Texas A&M Universities: « National Beef Quality Audit-1991 », « National Non-Fed Beef Quality Audit-1994 », « National Beef Quality Audit-1995 », « National Market Cow and Bull Beef Quality Audit-1999 », « National Beef Quality Audit-2000 ».

Progressivement, les injections intramusculaires de médicaments ont été désignées comme responsables de ces lésions musculaires (Eustice, 1996).

L'équipe de l'Université du Colorado surtout a publié de nombreuses enquêtes sur la fréquence des lésions au point d'injection et sur l'évaluation de leur impact économique pour la filière. Des études expérimentales ont également été réalisées.

Au fil des années, d'abord aux Etats-Unis puis de manière comparable au Canada, un programme général d'assurance qualité pour la filière a également été mis en place : « State and National Beef Quality Assurance (BQA) ». Des campagnes de sensibilisation des éleveurs ont été réalisées pour introduire les bonnes pratiques d'élevage, améliorer la réalisation des traitements et notamment limiter les lésions au point d'injection. Des enquêtes sur la fréquence des lésions ont continué d'être menées régulièrement pour évaluer l'efficacité de ce programme d'assurance qualité.

Aux Etats-Unis, pour des raisons pratiques surtout, les injections IM sont souvent réalisées en profondeur dans les muscles de l'arrière-train (*Biceps femoris* et *Gluteus medius* principalement). Les lésions ne sont pas visibles extérieurement, mais seulement au moment de la découpe des gros morceaux. De plus, selon le « National Market Cow and Bull Beef Quality Audit-1999 » (NMCBBQA-99), 44 % des produits des carcasses sont vendus en morceaux entiers, donc les lésions au site d'injection ne sont détectées que plus tard dans la filière de la viande bovine.

De nombreuses d'enquêtes ont été publiées à propos de l'évaluation des pertes économiques, mais elles concernent souvent des animaux de types différents (veau, bovin de boucherie, bovin de type laitier...), et les muscles concernés sont variables. Le « National Beef Quality Audit-1991 » évalue les pertes économiques liées aux lésions au point d'injection, uniquement pour les morceaux de « hauts de surlonge » (en anglais – top sirloin butts, muscles de la croupe), à 55 millions de dollars américains (USD) par an (George *et al.*, 1995b; George *et al.*, 1997). Les enquêtes de 1994 et 1999 attribuent des pertes de 0.66 USD et de 1.46 USD par animal liées

seulement à la présence de lésions au point d'injection. Les pertes totales ont été estimées pour l'année 1995 aux Etats-Unis à 200 millions USD. Il y a aussi chaque année environ 70.8 millions de repas affectés par la présence de morceaux de bœuf à palatabilité altérée par un parage inadéquat des lésions au point d'injection (George *et al.*, 1997)

Une étude menée entre novembre 1995 et juillet 2000, avec 15 périodes d'enquêtes dans différents états américains, a évalué la fréquence des lésions dans les morceaux « Haut de surlonge », découpés en ateliers et emballés en steaks, chez de jeunes bovins de boucherie. L'incidence des lésions au site d'injection dans ces morceaux a diminué entre 1995 et 2000, passant d'environ 11.4 % à 2.06 % lors de la dernière enquête. Par contre, dans la même période, le poids moyen des lésions par morceau atteint a augmenté de 192.5 g en 1995 à 249.8 g en juillet 2000, avec un maximum à 435.8 g en juillet 97. Cependant, chez des animaux de même type, l'incidence des lésions dans la « ronde de cuisse » était encore de 11.3 % pour l'enquête menée en 2000 (Roeber *et al.*, 2001).

Une enquête a été réalisée dans 11 usines de conditionnement de 1998 à 2000 chez des bovins de boucherie ou laitiers, issus d'élevages de toutes tailles. La fréquence cumulée de 1998 à 2000 des lésions au point d'injection dans les morceaux du quartier arrière, plus particulièrement la cuisse ou l'extérieur de la « ronde de cuisse » (muscles *Biceps femoris* et *Semitendinosus*) était de 49 % chez les bovins laitiers et de 26 % chez les races à viande. Une diminution a été observée entre 1998 et 2000, passant respectivement de 60 à 35 % et de 31 à 20 % pour les bovins laitiers et les bovins à viande. En 2000, il y avait encore 1 bovin à viande sur 5 et 1 bovin laitier sur 3 présentant des lésions dans la ronde de cuisse, l'ensemble représentant plus de 9 millions de dollars de pertes annuelles pour la filière bovine américaine (Roeber *et al.*, 2002).

Une étude canadienne a montré que des lésions musculaires étaient visibles en surface sur 1.3 % des carcasses à l'abattoir avant même la découpe. Une enquête plus détaillée a été menée chez 5 industriels canadiens recevant des morceaux de carcasse de différentes régions du Canada et depuis les Etats-Unis. Les morceaux étudiés plus particulièrement étaient les « hauts de croupe » (Top butts), les « palettes désossées » (boneless blades), l'« œil de ronde » (round eye), l'« intérieur de ronde » (inside round) et l'« extérieur de ronde » (outside round). 18.8 % des

« hauts de croupe » présentaient des lésions (intervalle de confiance 95 %, IC 95 % : 16.4 % à 21.2 %), avec un poids médian de 94 g de viande parée. Une différence a été mise en évidence entre les bovins provenant des Etats-Unis (9.0 %, IC 95 % de 5.9 à 12.9 %) et ceux provenant du Canada (22.3 %, IC 95 % de 10.4 à 25.3 %). La prévalence de lésions observée pour les bovins en provenance des Etats-Unis est comparable à la prévalence observée pendant la même période dans une enquête américaine. La prévalence de lésions chez les animaux provenant du Canada est comparable à la prévalence qui était observée aux Etats-Unis avant la mise en place des plans d'action pour la qualité de la viande bovine et la réduction des lésions au point d'injection. Une diminution importante de 50 % de la prévalence des lésions dans les hauts de croupe a pu être obtenue aux Etats-Unis en quelques années (de 1991 à 1996) après sensibilisation des éleveurs et producteurs bovins par des campagnes pour la qualité du bœuf. Au Canada, parmi les 5 morceaux inclus dans l'enquête, les palettes désossées présentaient la prévalence de lésions la plus forte, à 22.2 % (IC 95 % : 18.8 % à 25.7 %), avec un poids médian de 64 g de viande parée. Les pertes économiques totales liées au découpage et à l'élimination des lésions, ou à l'élimination complète des morceaux contenant des lésions ont été estimées pour les 5 morceaux de l'enquête seulement à 8.95 dollars canadiens par bovin abattu, soit plus de 19 millions de dollars canadiens par an pour la filière bovine canadienne (Van Donkersgoed *et al.*, 1997).

Une seconde étude a été menée quelques mois plus tard (Van Donkersgoed *et al.*, 1998). Les résultats étaient globalement comparables à ceux de la première étude. La prévalence des lésions dans les hauts de croupe était en diminution, passant de 22.3 % à 13.3 %, mais la proximité de réalisation des 2 études ne permet pas vraiment de conclure à une efficacité du plan d'action canadien ou à un effet de la saison de réalisation des 2 études.

b) Europe

En France, un point intéressant sur le problème des lésions au point d'injection a été réalisé en deux volets il y a une dizaine d'années à l'initiative des laboratoires Upjohn (Bost, 1994b). Tout d'abord, 207 éleveurs de bovins ont été interrogés par téléphone par l'institut BVA selon la méthode des quotas parmi des exploitations laitières ou de bovins viande, engraisant au moins dix taurillons (en moyenne 80 bovins dont 35

taurillons). Parmi les éleveurs interrogés, 63.2 % rencontraient un ou plusieurs problèmes lors de l'utilisation d'un produit antibiotique en général, le premier problème (28.5 %) étant l'observation de réactions locales au site d'injection, avant même les problèmes de contention (11.6 %) ou de délais d'attente (8.8 %). Les éleveurs citant les problèmes de réactions locales étaient plus nombreux parmi les utilisateurs de formulations « longue action ». Dans les deux ans qui avaient précédé le sondage, 45 % des éleveurs consultés se rappelaient avoir constaté des lésions ou réactions au point d'injection, plus de 40 % d'entre elles ayant eu des conséquences économiques moyennes ou graves (soins spécifiques nécessaires, impact sur l'appétit, saisies à l'abattoir, etc...). Parmi les éleveurs se souvenant des produits en cause, 75 % d'entre eux citaient les tétracyclines, le chloramphénicol ou leurs associations (Bost, 1994b).

Le deuxième volet était une enquête menée dans 3 abattoirs des Pays de Loire en 1992. Sur l'échantillon de 286 146 bovins abattus, 2.72 % ont fait l'objet de saisies partielles. 15 % de ces saisies étaient des colliers retirés pour infiltration à coloration anormale, abcès, tissu cicatriciel ou nécrose du ligament cervical. Le poids des 2/3 des saisies était compris entre 11.5 et 31.1 kg. Pour un bovin de conformation moyenne, le montant total des pertes occasionnées par une saisie de collier de 21 kg était évalué en 1992 à 340 Francs, soit 5.5 % du revenu brut d'une carcasse de bovin adulte. Une enquête portant sur les données d'abattage de 10 500 veaux de boucherie dans l'Ouest de la France a montré que 508 colliers avaient été saisis, soit une incidence de 0.5 % ; le poids moyen d'une saisie de collier était de 7.02 kg (Bost, 1994b).

Cependant, par rapport aux études menées en Amérique du Nord dans les ateliers de découpe et emballage, ces enquêtes réalisées en France à l'abattoir n'ont pu mettre en évidence que les lésions visibles extérieurement ou à la découpe de la carcasse. En effet, la majeure partie des lésions, en profondeur ou masquées par les dépôts de tissu adipeux, sont souvent non visibles à l'inspection visuelle de la carcasse (Roeber *et al.*, 2001). D'autre part, les poids des saisies partielles en abattoir apparaissent nettement supérieurs en France par rapport aux enquêtes américaines, ce qui peut également être expliqué par le fait que le parage a été mesuré en Amérique du Nord lors d'une découpe beaucoup plus « fine » des morceaux en ateliers de transformation et non lors de l'inspection « grossière » sur la

chaîne d'abattage. Nous ne disposons pas du même type d'information ni pour les ateliers de transformation pour la France, ni pour les chaînes d'abattage d'Amérique du Nord.

Chez le porc charcutier, en France, les injections intramusculaires sont largement pratiquées dans tout la filière. Les produits administrés sont principalement des vaccins, mais aussi des anti-infectieux et des anti-inflammatoires. A titre d'illustration, une truie à l'entrée en reproduction peut recevoir jusqu'à 12 injections intramusculaires de vaccins pendant la période de quarantaine, soit 6 à 8 semaines. Les injections sont presque exclusivement réalisées dans un endroit bien délimité du cou, côté gauche ou droit de l'animal, entre la base de l'oreille et le devant de l'épaule, une zone qui correspond à la pièce d'échine en boucherie. D'autres sites d'administration sont possibles et même plus commodes techniquement parfois, notamment à l'arrière train dans les muscles de la croupe ou de la cuisse, mais ils sont très peu utilisés en pratique en raison des risques de lésions dans les pièces nobles (longe ou jambon). Le poids économique réel pour la filière est difficilement chiffrable, car peu d'études sont disponibles. D'après une enquête en abattoir réalisée en 1984 par une coopérative porcine (Cooperl), 10.7 % soit 1 198 porcs sur un nombre total de 11 169 porcs avaient fait l'objet de saisies pour lésions tissulaires liées aux injections. Pour certaines coopératives, l'échine est systématiquement séparée du reste de la carcasse sur la chaîne d'abattage et retirée de la consommation ou inspectée minutieusement. L'impact économique peut même aller au-delà des conséquences sur la viande. En effet, la réalisation technique des administrations IM en production porcine est une des activités d'élevage des plus dangereuses, en raison des difficultés de contention des animaux. Ainsi, on estime que c'est une des premières cause d'accident de travail chez les porchers (Gérard Gestin, LT coopérative, communication personnelle).

En Irlande, une enquête a été menée dans 2 ateliers de transformation sur un échantillon de 45 076 quartiers de viande bovine (soit 11 269 animaux) au moment de la découpe en morceaux. Des lésions musculaires ont été trouvées dans 2 379 des quartiers examinés, soit 5.2 % des quartiers ou 21.1 % des animaux abattus (Beechinor *et al.*, 2001).

Aux Pays-Bas, une étude a montré que des sites d'injection étaient détectés et retirés de la chaîne d'abattage chez 3 % des porcs sains abattus (Nouws J. F., 1990). Une autre enquête sur la qualité des carcasses de porc aux Pays-Bas a montré que des lésions au site d'injection étaient encore présentes après la chaîne d'abattage dans 11 % des carcasses reçues par les bouchers détaillants, obligés de retirer entre 0.5 et 2 kg de viande autour de chaque lésion (Anonyme, 1991).

c) Conséquences sur les propriétés organoleptiques de la viande

La tendreté de la viande a été mesurée dans des muscles sains et dans des muscles présentant des lésions au point d'injection, dans des zones situées à différentes distances du centre des lésions. Les mesures des forces de cisaillement ont été effectuées à l'aide d'un appareil de type « Warner-Bratzler », et ont montré que la tendreté était significativement affectée jusque dans des zones distantes de 7.62 cm par rapport au centre des lésions. Dans ces zones, la force de cisaillement à appliquer reste supérieure aux limites acceptables pour des steaks vendus chez les détaillants. Les concentrations de collagène total, soluble et insoluble étaient significativement augmentées au centre des lésions, et diminuaient progressivement en fonction de l'éloignement des prélèvements de muscle par rapport au centre lésionnel (George *et al.*, 1995b).

d) Influence des pratiques vétérinaires et zootechniques :

Le nombre de lésions par site d'injection trouvé dans les carcasses issues de bovins laitiers est supérieur au nombre de lésions trouvé dans des carcasses d'animaux de boucherie. Ces chiffres sont en accord avec l'estimation faite en 1999 par le « National Market Cow and Bull Beef Quality Audit Strategy Workshop » que les vaches laitières reçoivent chaque année plus d'injections que les vaches à viande. Les lésions sont plus souvent localisées sur le dessus de la croupe chez les bovins viande, et plus sur la partie arrière verticale de la cuisse chez les bovins laitiers, reflétant des techniques de contention différentes entre les deux modes d'élevage (Roeber *et al.*, 2002). En général, les sites d'injection à l'arrière train sont préférés à l'encolure (voir tableau 1).

Tableau 1 – Sites d'injection IM chez les bovins techniquement préférés des éleveurs et des vétérinaires américains, selon une étude menée par le « National Animal Health and Monitoring System » (George et al., 1995a)

Site d'injection	Eleveurs	Vétérinaires
Croupe	52.0 %	47.7 %
Cuisse	9.6 %	8.7 %
Côtés de la queue	14.7 %	8.9 %
Encolure	19.8 %	27.0 %
Non précisé par les auteurs	3.9 %	7.7 %

3. Aspects éthiques

Au-delà des pertes économiques qui concernent les animaux de production, la mauvaise tolérance musculaire d'un produit injectable peut entraîner des douleurs plus ou moins importantes et des symptômes fonctionnels qui peuvent persister plus ou moins longtemps après l'administration.

a) Prévalence chez l'homme

Il a été estimé dans les années 1960 qu'aux Etats-Unis, plus d'un demi million d'injections IM étaient réalisées quotidiennement chez l'homme (Hill, 1967).

De nombreuses études de cas ont été publiées sur les complications et les lésions musculaires consécutives aux administrations intramusculaires chez l'homme. La prévalence exacte de ce type de complication reste inconnue (Beecroft et Kongelbeck, 1994).

Trois populations principales ont cependant été identifiées (Lefebvre HP, 1994; Mastaglia, 1982) :

1/ Les nouveaux-nés, notamment les prématurés qui font l'objet de soins intensifs. Dans certains cas, l'antibiothérapie par voie intramusculaire pratiquée en soins externes apporte de nombreux avantages en comparaison à l'hospitalisation (Losek et Gyuro, 1992).

2/ Les personnes atteintes de troubles psychiatriques chez lesquelles la voie IM est préférée pour des raisons de manque de coopération du sujet, ou parce qu'elle permet d'administrer des substances en « dépôt » à libération prolongée (Hay, 1995).

3/ Les patients en état de dépendance car soumis à des traitements anti-dououreux (opiacés par exemple) au long cours (Mastaglia *et al.*, 1971).

Ainsi, une étude prospective menée dans un service hospitalier de psychiatrie sur 217 patients (Hay, 1995) a évalué la prévalence et le type des complications rencontrées suite aux dépôts IM de neuroleptiques (chlorpromazine et molécules associées), avec des formulations standard ou concentrées, en administrations répétées sur une longue période de temps. Sur un total de 2 354 injections, 13.2 %

des patients traités ont eu des complications de type aigu, et 7.9 % de type chronique. Les complications (douleurs inhabituelles, saignements ou hématomes, sortie de liquide depuis le point d'injection, indurations de type inflammatoire et formation de nodules) étaient d'ailleurs plus souvent associées à des dépôts de formulations concentrées. Une estimation antérieure plus faible (7.7 %) avait été faite pour l'incidence des lésions induites par des dépôts d'halopéridol (Hamann *et al.*, 1990).

Une des rares études disponibles publiée avant ce travail est une enquête réalisée par le Boston Collaborative Drug Surveillance Program (Greenblatt et Allen, 1978). Dans cette enquête, sur 26 294 patients « tout-venant » hospitalisés, 46 % avaient reçu au moins une injection intramusculaire. Des effets indésirables surtout à court terme (abcès, indurations, érythèmes, douleurs, hématomes, saignements ou nodules) ont été enregistrés chez 0.4 % des sujets ayant reçu une IM. Cette étude a été réalisée sur un nombre important de patients, tous produits à usage intramusculaire confondus. Certaines molécules, comme la céfalotine sodique par exemple, ont été plus souvent mises en cause.

Dans une enquête réalisée chez 639 infirmières en pédiatrie, 23 % d'entre elles avaient observé des complications après des administrations intramusculaires qu'elles avaient réalisées (Beecroft et Redick, 1989). Le premier facteur entraînant la plupart des complications semble être la mauvaise réalisation technique de l'injection (McIvor *et al.*, 1991 ; Muller-Vahl, 1983).

Dans une étude rétrospective menée sur 1 384 cas de négligences ou de fautes professionnelles suspectées, 90 cas impliquaient des réactions indésirables suite à des administrations intramusculaires. 26 cas étaient des nécroses aseptiques après injection intra-artérielle par inadvertance, et des paralysies d'origine nerveuse étaient relatées dans 26 autres cas, impliquant surtout le nerf sciatique. Sur l'ensemble des réactions indésirables, 82 % étaient causés par des injections d'analgésiques ou d'antipyrétiques (Muller-Vahl, 1983).

b) Aspects cliniques

Les principaux effets secondaires des administrations IM sont des douleurs, des contractures musculaires et des lésions nerveuses, éventuellement compliquées par des abcès clostridiens, staphylococciques, ou stériles (Bergeson *et al.*, 1982). Les

autres effets indésirables sont des gangrènes, des réactions locales et systémiques ainsi qu'une mauvaise absorption du principe actif (Beecroft et Kongelbeck, 1994).

(1) Contractures musculaires

Le muscle *Quadriceps* est certainement le muscle où le plus grand nombre d'effets indésirables liés aux administrations IM a été publié.

Dans une revue de la littérature, sur 404 cas identifiés de fibrose du muscle *Quadriceps* chez l'homme, 78 % étaient des effets secondaires d'injections intramusculaires, 7 % étant d'origine congénitale et 15 % idiopathiques (Alvarez *et al.*, 1980). Des chiffres comparables étaient rapportés par le Ministère Japonais de la Santé : Sur 2 404 cas de contracture du quadriceps, 76 % avaient au préalable reçus des injections intramusculaires, 24 % étaient d'origine inconnue (Chiu *et al.*, 1975). Cette pathologie a surtout été décrite chez les enfants ou chez l'adulte, mais souvent en relation avec une ou plusieurs administrations IM reçues pendant l'enfance ou la période néonatale. Les symptômes les plus fréquemment décrits des contractures et des fibroses du muscle *Quadriceps* sont une limitation indolore de la flexion du genou et une luxation de la rotule (Bergeson *et al.*, 1982; Lefebvre HP, 1994). Lorsque les traitements par kinésithérapie sont inefficaces, la chirurgie réparatrice est indispensable. Ainsi, sur 1 155 patients japonais traités chirurgicalement, le résultat était satisfaisant chez 72 % des patients, il n'y avait pas d'amélioration pour 11 % d'entre eux, et 18 % n'étaient pas documentés (Chiu *et al.*, 1975).

Des contractures musculaires du muscle deltoïde ont également été décrites (Bergeson *et al.*, 1982) et, moins fréquemment, du muscle *Triceps* (Babhulkar, 1985).

(2) Lésions nerveuses

Les principales lésions nerveuses décrites sont des paralysies liées à l'atteinte du nerf sciatique lors d'injection dans les muscles glutéaux. Une étude de 21 cas de paralysie sciatique chez des enfants ou des nouveaux-nés a montré que de multiples formulations pouvaient être mises en cause (Gilles et French, 1961).

Chez le porc, une publication rapporte des troubles neurologiques importants liés à l'atteinte du nerf sciatique (Van Alstine et Dietrich, 1988). Sur un lot de 180 porcelets, 150 ont développé une paralysie du postérieur en une à huit semaine après une

administration IM à la cuisse droite d'un antibiotique à formulation « longue action ». Dans un autre groupe de 380 porcelets, c'est 30 % de l'effectif qui a présenté une paralysie du postérieur dans les 10 jours qui ont suivi l'administration d'un vaccin au même site d'injection.

Plus récemment, des cas d'automutilation ont été rapportés chez le lapin après administration IM d'un mélange anesthésique de kétamine, xylazine et acépromazine (Vachon, 1999). L'injection était pratiquée dans les muscles de la cuisse en un seul point. Chez le lapin anesthésié, une automutilation importante des doigts de la patte arrière a été constatée 2 semaines après l'administration. A l'histologie, les nerfs sciatiques correspondant aux pattes affectées ont montré une dégénérescence axonale et une inflammation périphérique. En conclusion, l'auteur recommande les muscles lombaires comme lieu d'injection IM chez le lapin plutôt que les muscles de la cuisse (Vachon, 1999).

(3) *Abcès et septicémies*

Une étude menée entre 1988 et 1993 dans un hôpital suisse a montré que sur 112 diagnostic de septicémie à staphylocoque (*S. aureus*), 5 % avaient eu une injection intramusculaire comme voie d'entrée (Rossi et Conen, 1995).

(4) *Myofasciite à macrophages*

La myofasciite à macrophages est une pathologie émergente en médecine humaine. Les symptômes et les lésions ont été décrites depuis 1993 par le Groupe d'Etudes et Recherche sur les Maladies Musculaires Acquises et Dysimmunitaires (GERMMAD) de l'Association Française contre les Myopathies (AFM) (Gherardi *et al.*, 1998). Les symptômes sont principalement des myalgies diffuses, des arthralgies ou des faiblesses musculaires, plus rarement des asthénies ou des syndromes fébriles. Il s'agit d'une myopathie de type inflammatoire : le tissu sous-cutané, ainsi que l'épimysium, l'endomysium et le péri-mysium présentent des infiltrations massives composées de larges cellules histiocytaires. L'origine de cette entité a pu être précisée plus tard comme étant secondaire à l'administration IM de vaccins adjuvés à l'hydroxyde d'aluminium. En effet, les lésions microscopiques ont pu être reproduites par l'administration IM de vaccins chez le rat, et la microanalyse aux rayons X ainsi que l'analyse par spectrométrie d'absorption atomique montrent que les inclusions intracytoplasmiques décelées chez l'homme contiennent bien de

l'aluminium (Gherardi *et al.*, 2001). Cependant, sans groupe d'individus témoins, ces études ne permettent pas d'affirmer avec certitude que les symptômes cliniques sont associés aux lésions histologiques, et l'hydroxyde d'aluminium en outre est, depuis les années 40, l'adjuvant vaccinal le plus utilisé dans le monde.

4. Aspects pharmacocinétiques et efficacité

Les principes actifs administrés dans le muscle sont généralement absorbés vers la circulation systémique, conduisant à des concentrations sanguines ou plasmatiques mesurables.

En pharmacocinétique, la biodisponibilité est la fraction de la dose administrée qui rejoint la circulation systémique et la vitesse à laquelle l'absorption a lieu.

La fraction biodisponible peut être mesurée expérimentalement par une étude pharmacocinétique de la formulation administrée successivement par voie intraveineuse (biodisponibilité de 100 % par définition) et par voie intramusculaire. Après chaque administration, l'Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques est mesurée. Le rapport de l'aire des concentrations par voie intramusculaire et de l'aire des concentrations par voie intraveineuse, corrigé par le rapport des doses administrées si elles sont différentes, donne la biodisponibilité absolue du principe actif par voie intramusculaire (Gibaldi et Perrier, 1982). Si une fraction incomplète de la dose est absorbée, la biodisponibilité est inférieure à 100 %, ce qui peut signifier qu'il reste du principe actif au site d'injection, sous forme insoluble ou au sein d'une lésion tissulaire, non disponible pour l'absorption vasculaire.

C'est uniquement lorsque la lésion est visible extérieurement à l'abattage ou à la découpe que le muscle est retiré de la consommation humaine. Même si la lésion n'est pas visible, des concentrations conséquentes peuvent être observées localement, au site d'injection, ce qui peut poser un problème de santé publique (Nouws J. F., 1990).

La fraction biodisponible varie en fonction du site d'administration. Ainsi, chez le veau, pour une formulation d'amoxicilline, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques sur les 24 premières heures est supérieure de 29 % lorsque l'administration a été réalisée dans les muscles de l'encolure par rapport aux

muscles de la croupe (Marshall et Palmer, 1979). Chez le cheval, une formulation à base de procaïne pénicilline G a été administrée en intraveineuse, puis en crossover dans plusieurs sites musculaires. Ainsi, les injections dans les muscles de l'encolure conduisent à des biodisponibilités plus fortes à 12 h (69.7 %), par comparaison avec les muscles du poitrail (42.1 %) et les muscles glutéaux (34.4 %). Des tentatives d'hypothèses explicatives sont données par les auteurs. Les chevaux étant immobilisés pendant l'essai, seule l'encolure a continué de présenter une activité mécanique qui a pu favoriser l'absorption par un débit sanguin accru. De plus, les injections strictement intramusculaires peuvent conduire à un collapsus des vaisseaux sanguins ou lymphatiques du muscle par augmentation de la pression, et donc diminuer la vitesse d'absorption. En zone cervicale, au contraire, les produits diffusent souvent entre les fascias musculaires, ce qui entraîne peu de compression musculaire et vasculaire, et donc une absorption plus rapide par comparaison aux autres sites d'injection strictement intramusculaires (Firth *et al.*, 1986). Une étude comparative chez le cheval avec une formulation de phénylbutazone injectée par voie IV et IM a également montré que la biodisponibilité absolue est meilleure lors d'administration dans l'encolure (112 %) par rapport à l'injection dans les muscles des masses glutéales (93.2 %) (Toutain *et al.*, 1995).

Dans de nombreux cas, les injections sont réalisées au sein de faisceaux musculaires, le produit peut alors facilement être déposé entre deux fascias, soit en localisation « intermusculaire » plutôt qu'en intramusculaire strictement. La distribution locale des substances injectées a été évaluée chez le cheval (Boyd, 1987), le chien (Autefage *et al.*, 1990) et le porc (Houpert *et al.*, 1993) principalement. Dans ces études, une méthodologie comparable a été utilisée, consistant à injecter un produit radio-opaque dans plusieurs sites musculaires. Très rapidement après l'injection, l'euthanasie était pratiquée et des cryocoupes transversales étaient effectuées dans les zones des sites d'injection. La localisation des produits injectés a pu être déterminée par radiographie des tranches obtenues. Ainsi, pour avoir la plus grande probabilité de déposer le produit en intramusculaire stricte, il faudra réaliser les injections dans des sites anatomiques précis en fonction des espèces :

- Chez le cheval, dans les muscles de l'encolure, le site d'injection doit être très précisément localisé afin d'éviter que le produit ne soit administré sur les vertèbres

ou le ligament nuchal. Plusieurs zones cervicales ont été testées, la meilleure est une zone en regard de la cinquième vertèbre cervicale, au dessus du muscle brachiocéphalique et en dessous du ligament nuchal (Boyd, 1987).

- Chez le chien, les zones cervicale, lombaire, l'arrière et l'avant de la cuisse ont été testées. Seules les localisations lombaires (muscle *Longissimus dorsi*) et les muscles antérieur de la cuisse (muscle *Quadriceps femoris*) ont conduit à des localisations strictement intramusculaires des produits sur la totalité des injections réalisées. Pour les autres localisations, les produits administrés étaient soit déposés entre les fascias, soit à la fois entre les fascias et en intramusculaire stricte (Autefage *et al.*, 1990).

- Chez le porc, 4 sites d'administration ont été testés : la zone glutéale, la région lombaire, l'encolure antérieure juste en arrière de l'oreille et l'encolure postérieure. Pour les sites d'administration dans l'encolure, l'aiguille a été positionnée horizontalement ou verticalement. Le meilleur site garantissant un dépôt intramusculaire est la zone lombaire, mais on observe souvent un reflux en zone sous-cutanée le long du trajet de l'aiguille. L'utilisation d'aiguilles plus fines réduit le reflux, mais augmente le risque de cassure du matériel dans le muscle pendant l'injection. La technique utilisée dans les élevages, dans l'encolure en arrière de l'oreille avec l'aiguille en position horizontale produit un dépôt intramusculaire avec une forte probabilité (Houpert *et al.*, 1993).

La vitesse d'absorption peut être modulée par la formulation pharmaceutique du principe actif. Une absorption rapide peut-être recherchée, avec obtention d'un pic de concentrations plasmatiques rapidement après administration. Au contraire, les formulations appelées « dépôts », « retard » ou « longue action » conduisent à des concentrations plasmatiques maintenues pendant une longue durée. Ce type de formulation « dépôts » est très utilisé en psychiatrie chez l'homme (Hay, 1995). Chez l'animal, les formulations « longue action » sont également très employées, notamment en antibiothérapie. En effet, ces formulations permettent de réduire le nombre d'administrations à pratiquer sur les animaux, et donc de limiter le stress des animaux et de diminuer la fréquence des opérations de manipulation et de contention, très chronophages, surtout pour les cheptels importants en élevage extensif. De plus, la compliance des éleveurs au traitement est accrue, limitant les possibilités de développement d'antibiorésistance. L'exemple le plus représentatif est

celui de l'oxytétracycline. Cet antibiotique existe en formulation conventionnelle et en formulation « longue action », pour laquelle une seule administration remplace trois administrations de formulation conventionnelle à 24 heures d'intervalle (Barrois, 1985). Dans cette formulation, l'effet « longue action » est liée à l'excipient utilisé, la 2-pyrrolidone, qui induit une irritation locale au site d'injection et retarde l'absorption, et à une dose administrée supérieure par rapport à la formulation conventionnelle (Nouws J. F. *et al.*, 1990). Chez le veau, l'effet « longue action » a été observé pour des doses de 27.9 mg/kg d'oxytétracycline, mais pas pour les doses de 7.2 et 18.1 mg/kg (Nouws J.F.M., 1982).

Une étude australienne menée chez des bovins sur les résidus d'oxytétracycline au site d'injection a montré qu'il restait toujours du principe actif à des concentrations très supérieures aux limites maximales autorisées 30 jours après le traitement, alors que le temps d'attente pour ces formulations « longue action » en Australie est de 21 jours seulement (Mawhinney *et al.*, 1996).

Dans la famille des bêta-Lactamines, les formulations à base de procaine ont une action courte et les résidus de benzylpénicilline persistent au site d'injection pendant moins de 2 semaines. Il n'y a que très peu, voire pas du tout de lésion visible au site d'injection. Cependant, au Canada, les pénicillines sont les antibiotiques les plus souvent rencontrés dans les échantillons suspects (Korsrud *et al.*, 1993). Les formulations huileuses, de type benzathine benzylpénicilline ou trihydrate/anhydrate d'ampicilline et d'amoxicilline induisent des lésions peu visibles après 2 semaines, mais les sites d'injection contiennent encore des concentrations élevées d'antibiotiques pendant au moins 10 semaines (Nouws J. F., 1990). Il faut noter que les résidus de pénicilline dans la viande représentent un risque important pour les personnes sensibilisées (Korsrud *et al.*, 1993).

Selon Nouws et coll., la persistance de principe actif au site d'injection dépend principalement des caractéristiques de la formulation utilisée, entraînant plus ou moins de lésions musculaires. Il a été montré chez 3 espèces (mouton, porc, veau) que la présence de résidus après des administrations de différentes formulations d'oxytétracycline était en grande partie liée au degré constaté d'irritation musculaire (Nouws J. F. *et al.*, 1990). Elle dépend aussi du volume de l'injection et du site d'administration. Ainsi, l'absorption est plus rapide lors d'administration dans les muscles de l'encolure ou de l'épaule (Nouws J. F., 1990). Dans une autre étude chez

des bovins de boucherie, le teneur en résidus était corrélée à la taille des lésions dans la cuisse mais pas dans le cou (Van Donkersgoed *et al.*, 1999).

Chez l'homme, l'efficacité des vaccins IM est moindre lorsqu'ils sont administrés de façon inadéquate dans les muscles. Ainsi, au cours du développement du vaccin de l'hépatite B, les doses étaient administrées par injection dans le muscle deltoïde, avec une séroconversion chez plus de 90 % des sujets. Lors d'études complémentaires d'efficacité, la séroconversion n'était atteinte que dans la moitié des cas, ce phénomène étant lié à la voie d'administration qui avait été changée du deltoïde à la fesse, sans modification du type d'aiguilles utilisées, devenues trop courtes pour un dépôt intramusculaire strict (Poland *et al.*, 1997).

5. Recommandations techniques

(1) Chez l'animal

Des recommandations techniques pour la réalisation des administrations IM ont été éditées à l'occasion des programmes de sensibilisation des éleveurs. On peut citer pour illustration les recommandations générales pour les bovins du programme : « Canadian Cattlemen's – Quality Starts Here » (Van Donkersgoed *et al.*, 2000):

- 1/ Utiliser des aiguilles propres
- 2/ Utiliser des aiguilles différentes pour reconstituer les solutions et injecter
- 3/ Ne jamais re-prélever dans le flacon avec une aiguille ayant été utilisée pour injecter
- 4/ Injecter les doses vaccins en SC, dans la zone du cou
- 5/ Ne pas utiliser de dispositifs à projectiles (fléchettes ou pistolet) pour traiter les bovins
- 6/ Utiliser des aiguilles de 18 ou 16-Gauge pour les injections SC et IM, et des aiguilles de 14-Gauge pour les injections IV.
- 7/ Ne pas mélanger différentes solutions vaccinales ou anti-infectieuses dans la même seringue
- 8/ Identifier les seringues clairement pour les différents produits utilisés et les nettoyer abondamment avant l'utilisation d'autres produits.

Des programmes comparables sont menés dans la filière porcine, au cas par cas, à l'initiative des coopératives de production par exemple.

Un mode d'administration innovant sans aiguille, par « mini projectiles » a été décrit récemment, notamment pour l'administration de vaccins chez le porc et les bovins (van de Wijdeven, 2002). Il s'agit de l'administration d'une formulation propulsée par air comprimé à travers la peau de l'animal, sans contact entre l'appareil d'administration et la surface cutanée, le dispositif étant situé à 3-10 mm de la peau. Ce système limiterait les problèmes de contaminations croisées et faciliterait l'administration aux troupeaux en simplifiant la contention des animaux. Les lésions tissulaires sont cependant similaires à celles observées après une administration à l'aiguille (van de Wijdeven, 2002).

(2) Chez l'homme

Beecroft et coll. ont réalisé des revues de la littérature sur les aspects techniques pour fournir des recommandations de bonnes pratiques au personnel soignant et infirmier (Beecroft et Kongelbeck, 1994). Nous reprendrons ici les principaux points à aborder par le personnel avant de réaliser des injections IM :

(a) Site d'injection

Une enquête a été menée aux Etats-Unis dans 10 services hospitaliers pédiatriques de plus de 100 lits (Beecroft et Redick, 1990). L'analyse des réponses de 639 infirmières montre qu'il y a une méconnaissance générale des limites anatomiques des sites d'injection IM.

Il n'y a pas de consensus dans la littérature sur les sites d'injection à adopter, particulièrement chez les plus jeunes patients. De plus, les différents sites ne sont pas toujours anatomiquement décrits dans les articles avec suffisamment de précision (Beecroft et Redick, 1990).

(i) Fesse

Deux sites principaux au sein des muscles glutéaux sont décrits dans la littérature : le site dorso-glutéal et le site ventro-glutéal (voir figure 1). Le principal inconvénient

de cette région anatomique est la couche sous-cutanée de tissu adipeux, d'épaisseur très variable, qui recouvre le muscle dans cette région, ce qui peut conduire à une mauvaise absorption des produits administrés. C'est une zone d'injection pour laquelle il y a le plus de différences de description selon les auteurs (Beecroft et Redick, 1990).

Chez les enfants, l'usage du site dorso-glutéal n'est pas recommandé avant l'âge de 2 ans. Il a été pourtant utilisé pour 21 % des patients de cette catégorie selon une enquête menée dans un centre d'urgences pédiatriques (Losek et Gyuro, 1992). C'est un lieu d'injection qui nécessite beaucoup de soins et une bonne expertise. En effet, il est possible, en région glutéale, d'entraîner des lésions de plusieurs faisceaux nerveux. Pour Hill, l'aire glutéale est la zone idéale pour les injections chez les enfants, quel que soit leur âge, pourvu que l'injection soit réalisée dans la fesse en insérant l'aiguille perpendiculairement à la table sur laquelle est allongé le patient (Hill, 1967).

Il est préférable de réaliser l'injection en région ventro-glutéale, c'est-à-dire dans le quadrant supérieur externe de la fesse (Bergeson *et al.*, 1982). La zone « quadrant supérieur externe de la fesse » est cependant trop large, car des vaisseaux et des ramifications nerveuses importants sont présents dans la zone la plus médiale (Muller-Vahl, 1983). Plus précisément, la zone d'insertion de l'aiguille doit être un triangle plus latéral constitué par la tête du grand trochanter, le tubercule de la crête iliaque et l'épine iliaque (McIvor *et al.*, 1991) : c'est le site de choix quel que soit l'âge du patient (Beecroft et Kongelbeck, 1994), et probablement moins risqué en termes de complications (Beecroft et Redick, 1990). Pourtant, selon l'enquête sus-citée, le site ventroglutéal n'était pas traité dans la formation de 80 % des infirmières interrogées (Beecroft et Redick, 1989).

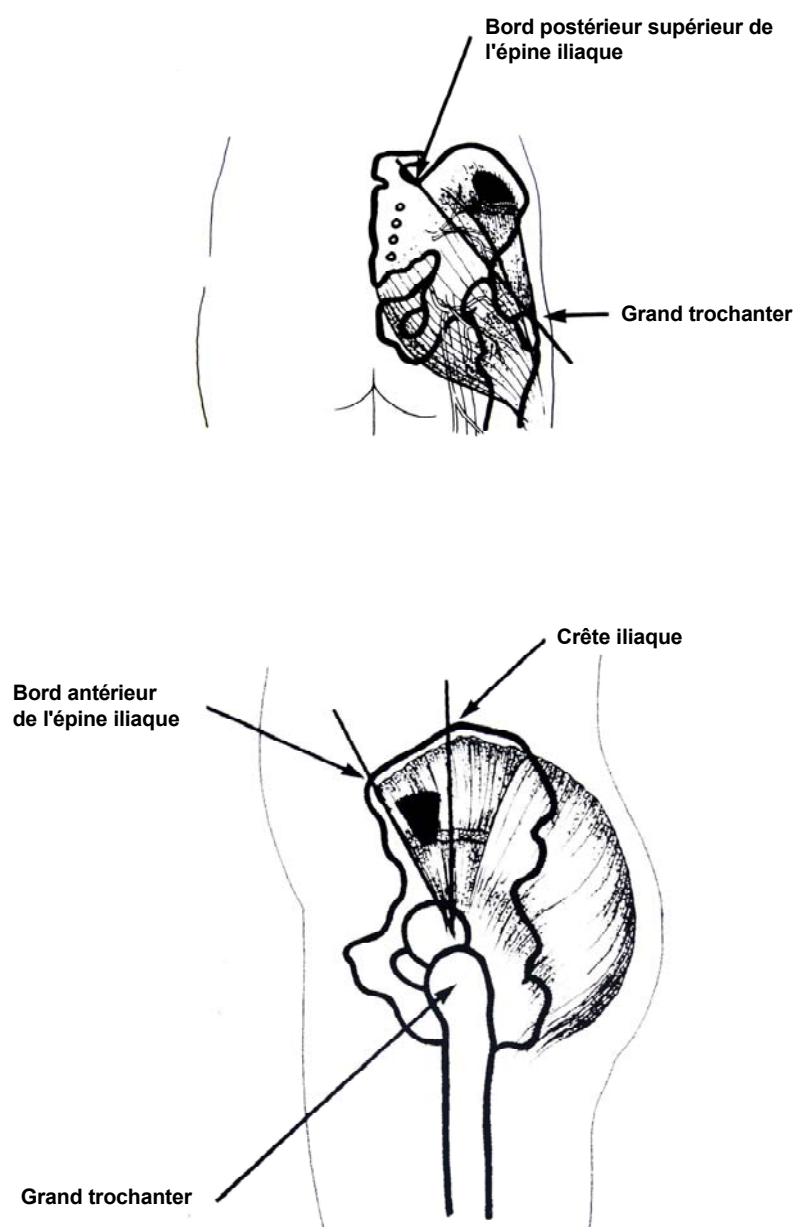


Figure 1 – Localisation des sites d'injection intramusculaire dorsoglutéal (haut) et ventroglutéal (bas) (modifié d'après Beecroft P.C. and Redick S.A., Nurse Educator, 1990, vol 15, n°4)

(ii) Cuisse

L'injection doit être pratiquée dans le quadrant supérieur latéral de la cuisse, dans le muscle quadriceps fémoral. L'aiguille doit être dirigée vers le bas, à un angle de 45° par rapport avec l'axe long de la jambe et un angle de 45° par rapport au plan de l'arrière de la cuisse. C'est ce site qui est particulièrement recommandé chez les très jeunes enfants car le muscle quadriceps y est déjà bien développé (Bergeson *et al.*, 1982) (Voir figure 2).

(iii) Epaule

Chez les sujets plus âgés, l'injection peut être pratiquée dans le muscle deltoïde ou dans le triceps brachial (non recommandé). Dans le deltoïde, l'administration doit être réalisée à mi-distance entre le processus de l'acromion et la tubérosité deltoïdienne (voir figure 3).

(b) Formulations à écarter

Selon Beecroft et col., les principales formulations à éviter chez l'homme par la voie IM sont : la céphalotine sodique, la tétracycline hydroxychlorée, le paralaldéhyde, le colistiméthate de sodium, la digoxine et la diphénylhydantoïne (Beecroft et Kongelbeck, 1994). De nombreuses autres formulations pourraient néanmoins être à l'origine de lésions au point d'injection.

(c) Administrations répétées

D'autres voies d'administration sont à envisager lors de traitements chroniques. Lors d'administrations IM répétées, les sites d'injection IM utilisés doivent être recensés et notés par le praticien pour permettre une rotation entre les administrations chez le même patient (Beecroft et Kongelbeck, 1994).

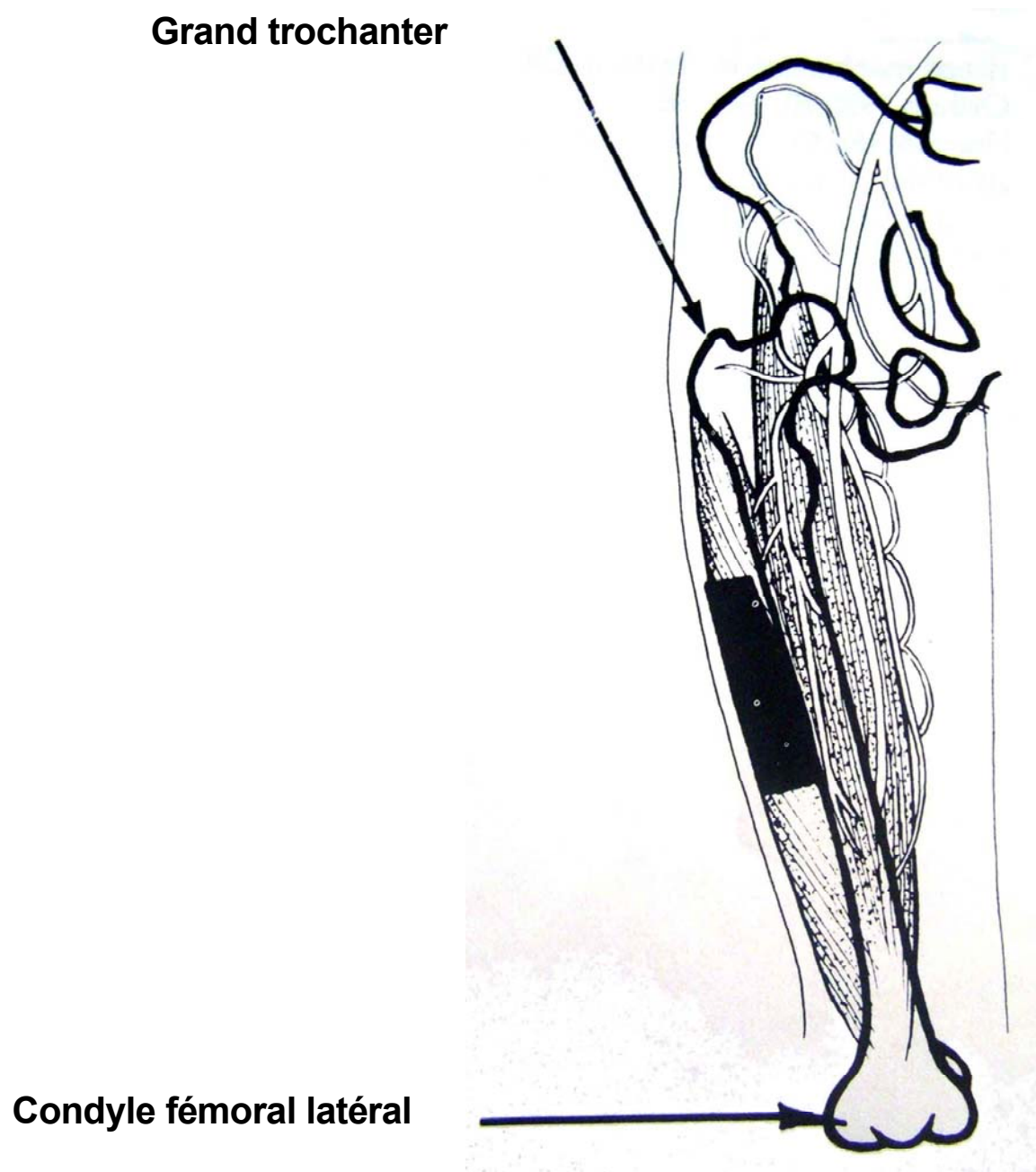


Figure 2 - Localisation du site d'injection intramusculaire de la cuisse (modifié d'après Beecroft P.C. and Redick S.A., Nurse Educator, 1990, vol 15, n°4)

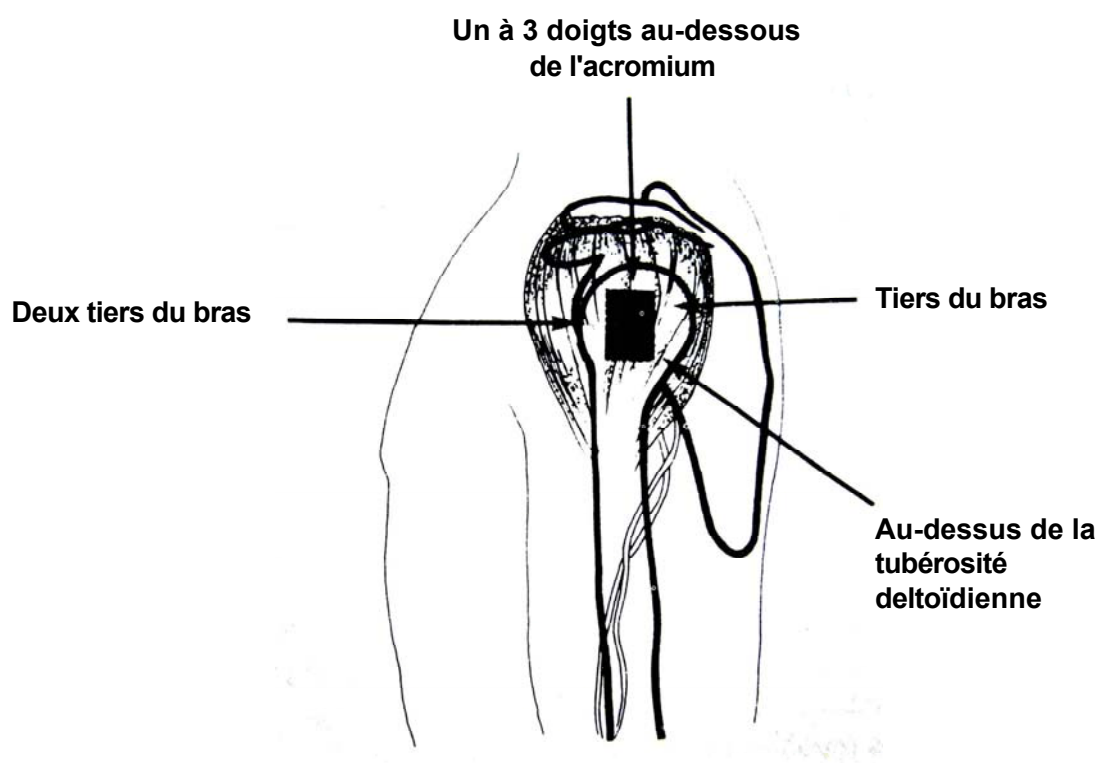


Figure 3 – Localisation du site d'injection intramusculaire deltoïdien (modifié d'après Beecroft P.C. and Redick S.A., Nurse Educator, 1990, vol 15, n°4)

(d) Longueur de l'aiguille

Des approches précises ont été développées pour l'injection IM dans certaines situations. Ainsi, pour garantir l'injection des vaccins dans le muscle deltoïde strictement et éviter les reflux en zone sous-cutanée, l'épaisseur de la couche adipeuse a été mesurée par échographie haute résolution sur un panel de 220 adultes sains. Les patients se présentaient pour une vaccination contre l'hépatite B, et comprenaient 126 femmes pesant de 47,7 à 107,5 kg et 94 hommes pesant de 59,3 à 117,6 kg (Poland *et al.*, 1997). L'épaisseur sous-cutanée en regard du deltoïde est en général supérieure chez les femmes. Ainsi, selon les auteurs, les aiguilles conventionnelles de 16 mm de longueur fournies en général avec les seringues vaccinales ne permettraient pas d'atteindre 5 mm de profondeur dans le muscle chez 17 % des hommes et 48,4 % des femmes. Des recommandations de longueurs d'aiguilles plus adaptées sont données par segments : (1) Pour les hommes de 60 à 118 kg, la pénétration d'au moins 5 mm dans le muscle est permise par une aiguille de 25 mm de long. (2) Chez les femmes de moins de 60 kg, une aiguille de 16 mm est suffisante, tandis que (3) pour les femmes entre 60 et 90 kg, une aiguille de 25 mm est conseillée. (4) Au-dessus de 90 kg, il faut utiliser une aiguille de 38 mm de longueur (Poland *et al.*, 1997).

Dans le cas des autres sites d'administration (cuisse, fesse) il est cependant difficile d'évaluer cliniquement l'épaisseur du tissu sous-cutané chez les sujets à traiter. Ainsi, les recommandations générales suivantes sont données :

(1) Chez les nourrissons et les jeunes enfants, utiliser une aiguille de moins de 25 mm de long. (2) Chez l'adulte, il faut utiliser une aiguille d'au moins 35 mm de long, et l'enfoncer complètement lors de l'injection. (3) Chez l'adulte obèse, il faut choisir une autre voie d'administration (Beecroft et Kongelbeck, 1994).

(e) Patients en soins intensifs

Il faut tout d'abord déterminer l'état des masses musculaires. Chez les patients alités ou malnutris en particulier, il ne faudra pas injecter de volumes supérieurs à 1 mL.

Lors de coma ou d'anesthésie, les administrations dans les fessiers sont à proscrire. En effet, le tonus musculaire, diminué dans ces situations, entraîne un risque accru de lésions du nerf sciatique.

Lors d'hypotension ou d'hypovolémie, il y a souvent une diminution de la perfusion sanguine musculaire. Il convient alors d'éviter la voie IM dans la mesure du possible.

Enfin, les patients diabétiques qui présentent des brûlures ou des leucémies sont prédisposés aux complications des administrations IM. Il convient de les réaliser avec le plus grand soin chez ces patients (Beecroft et Kongelbeck, 1994).

B. Facteurs lésionnels identifiés

Plusieurs revues bibliographiques ont été réalisées sur la problématique des lésions au point d'injection (Bost, 1994a; Kern, 1987; Lefebvre HP, 1994; Rasmussen, 1978, 1979; Svendsen O, 1988).

De nombreux facteurs ont une influence sur l'apparition et le développement de réactions locales ou de lésions après une administration IM. Parmi ces facteurs, on peut citer la formulation administrée, la technique d'injection utilisée, et enfin le muscle choisi.

1. Effet du principe actif

Le principe actif administré seul est souvent myotoxique. Dans les cas de réactions locales rapportés par la littérature, il est souvent difficile de séparer le rôle du principe actif de celui de la formulation finale et des conditions d'utilisation dans le développement des lésions. Les principes actifs concernés sont le plus souvent des antibiotiques, des anti-inflammatoires, des anesthésiques, des tranquillisants, des vitamines et des antiparasitaires.

Une liste détaillée des principaux principes actifs mis en cause dans la littérature a été réalisée précédemment (Lefebvre HP, 1994) pour chaque espèce animale ou chez l'homme sous forme de tableaux. Une étude bibliographique détaillée a également été menée pour les anti-infectieux utilisés chez l'animal (Bost, 1994a). Nous citerons dans ce paragraphe quelques exemples d'études cliniques ou expérimentales plus récentes.

a) Anti-inflammatoires

Chez la vache laitière, la quantité de muscle lésé après administration de différentes formulations de molécules anti-inflammatoires dans les muscles de l'encolure a été évaluée par une méthode basée sur la pharmacocinétique de la créatine kinase, en utilisant les formules proposée par Lefebvre et coll. (Lefebvre H. P. *et al.*, 1994). Les

plus irritantes étaient les formulations de phénylbutazone et de flunixin (78 et 91 g de muscle atteint, respectivement), significativement plus irritantes que les formulations de kétoprofène et de métamizole (42 et 35 g respectivement). De manière intéressante, la solution de métamizole a provoqué le plus de signes de douleur chez tous les animaux administrés alors que c'était la formulation la plus faiblement irritante en termes de lésion musculaire. Ces résultats montrent l'absence de corrélation entre la douleur constatée liée à l'administration et l'étendue de la lésion musculaire (Pyorala *et al.*, 1999).

b) Antibiotiques

La tolérance locale de huit formulations d'antibiotiques (administrées dans l'encolure) ont été comparées chez la vache par le suivi des aires sous la courbe (AUC) des activités plasmatiques de créatine kinase sur les 48 premières heures (Pyorala *et al.*, 1994). Une formulation d'enrofloxacin a induit la plus forte augmentation d'activité CK (16 fois le niveau plasmatique basal); la moins irritante, une formulation de procaine-pénicilline G, était comparable à l'administration d'une solution de NaCl. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les administrations des mêmes volumes d'une formulation d'oxytétracycline standard (à 10 %) et celle d'oxytétracycline « longue action » (à 20 %). Dans cette étude, les observations cliniques des réactions locales n'étaient pas en agrément avec les résultats de l'analyse de l'activité CK plasmatique au cours du temps.

c) Anesthésiques locaux

De nombreux anesthésiques locaux entraînent des lésions au point d'injection. La bupivacaïne, par exemple, est un principe actif très largement utilisé comme modèle expérimental de lésion musculaire permettant la régénération complète du tissu. Chez l'homme, la tolérance locale de la bupivacaïne a été évaluée suite à une injection dans le triceps brachial par une méthode basée sur l'élévation de la créatine kinase plasmatique, par comparaison avec l'imagerie médicale par résonance magnétique (Nosaka et Sakamoto, 1999).

2. Effet de la concentration et du volume

Le degré de lésion musculaire est proportionnel à la concentration et au volume des formulations administrées (Svendsen O, 1988).

Chez le porc, les formulations d'oxytétracycline à 10 % sont mieux tolérées que les formulations à 20 % (Nouws J. F., 1984). Il semble également y avoir une relation positive entre volume et lésion (Diness, 1985). Chez le lapin, à dose constante de principe actif (zuclopenthixol), un petit volume d'une solution très concentrée provoque moins de lésions qu'un volume important d'une solution moins concentrée (Svendsen O. et Blom, 1984).

Néanmoins, dans le développement d'une formulation, la recherche d'un compromis entre volume et concentration pour améliorer la tolérance locale reste difficile.

3. Effet de l'excipient

Au même titre que le principe actif, l'excipient ou l'ensemble des excipients contenus dans la formulation pharmaceutique peuvent avoir un potentiel myotoxique.

Ainsi, une étude menée chez l'homme, comparant deux formulations différentes de piroxicam en injections IM répétées, a montré que celle contenant un mélange de propylène glycol, d'acide benzylique et d'eau induisait des concentrations d'activité CK plasmatique significativement supérieures à celles, stables, obtenues après injection d'une formulation seulement aqueuse (Vaccarino *et al.*, 1989). Chez l'animal, plusieurs formulations d'oxytétracycline sont disponibles contenant des excipients différents. Une étude comparant deux formulations d'oxytétracycline-HCl à 10 % a montré que la formulation contenant de la polyvinylpyrrolidone n'entraînait aucun signe clinique et significativement moins de lésions au site d'injection que la formulation contenant du glycérol formaldéhyde. Chez le mouton, cette dernière formulation induit des réactions de douleur sévères dans les 10 minutes suivant l'administration (Nouws J. F. *et al.*, 1990). En général, les lésions musculaires sont beaucoup plus sévères pour les formulations de type « longue action », contenant des excipients comme la 2-pyrrolidone ou la N-méthylpyrrolidone, que pour les formulations conventionnelles, à 10 % d'oxytétracycline. Cependant, la concentration du principe actif est deux fois supérieure (20 %) dans les formulations « longue action », les effets de l'excipient et de la concentration du principe actif sont alors

confondus. De plus, la libération lente du principe actif à partir du site d'injection repose en partie sur le caractère précipitant dans le tissu lié à l'excipient employé.

Les processus de découverte des principes actifs conduisent actuellement à des molécules de plus en plus lipophiles qui nécessitent des solvants organiques qui ont souvent des propriétés myotoxiques comme excipients. Il s'agit principalement du propylène glycol, du polyéthylène glycol, de l'éthanol, du diméthyl sulfoxyde, de la N-méthyl-2-pyrrolidone, du glycofural, du solketal, du glycerol formaldéhyde, de l'acétone, et plus rarement de l'alcool tetrahydrofurfuryl, du diglyme, du diméthyl isosorbide, et de l'éthyl lactate (Mottu *et al.*, 2000). Les propriétés irritantes du propylène glycol, du glycérol formaldéhyde et du diméthylacétamide ont été démontrées à plusieurs reprises (Nouws J. F. *et al.*, 1990; Rasmussen, 1979; Svendsen O, 1988). Des mélanges d'eau et de propylène glycol, d'éthanol, ou de polyéthylène glycol 400, qui sont utilisés dans des formulations à usage parentéral, sont myotoxiques, entraînant la libération de CK dans un modèle de muscle de rat isolé (Brazeau et Fung, 1989). Pour le propylène glycol et l'éthanol, le calcium semble impliqué dans le développement de la toxicité, plutôt par une mécanisme intracellulaire que par une solubilisation directe de la membrane plasmique (Brazeau et Fung, 1990). Aucune relation n'a pu être dégagée entre les paramètres physico-chimiques (constante diélectrique, pH, tension superficielle, viscosité) de certains excipients (propylène glycol, éthanol, polyéthylène glycol 400 mélangés à l'eau) et leur potentiel myotoxique (Brazeau et Fung, 1989). Plus largement, une étude descriptive a été réalisée sur 304 formulations injectables utilisées en pratique hospitalière : 70 % de ces préparations avaient un pH compris entre 5.0 et 7.9, et il n'y avait pas de corrélation entre le pH et l'étendue des lésions pour les pH compris entre 3 et 10 (Oshida *et al.*, 1979). De même, chez le porc, aucune corrélation n'a été démontrée entre le pH de différentes formulations (entre 4.0 et 9.2) et l'importance des lésions constatées (Martineau *et al.*, 1980).

Certains excipients sont pourtant mieux tolérés. Ainsi, les excipients de nature huileuse n'entraînent que peu de lésions (Svendsen O. et Aaes-Jorgensen, 1979) et peuvent même atténuer le caractère irritant de certains principes actifs. Une étude menée chez le lapin a montré la myotoxicité d'une série de neuroleptiques administrés en solution aqueuse et la réduction ou la suppression des lésions par l'utilisation de formulations huileuses, comme l'huile de sésame, l'oléate de méthyle,

le squalane et « Viscoleo » (un excipient composé de triglycérides végétaux) (Svendsen O., 1983b).

4. Formulations innovantes

Les β -cyclodextrines sont des molécules utilisées de plus en plus pour améliorer la solubilité des principes actifs via la formation de complexes qui incluent les principes actifs au sein des cyclodextrines. Ainsi, une formulation de prednisolone à base de cyclodextrine anionique a été comparée à une formulation conventionnelle à base de polyéthylène glycol 400 et d'éthanol. La nouvelle formulation est significativement moins irritante pour le muscle, étant comparable à une injection de solution de chlorure de sodium isotonique, et conduit à une biodisponibilité du principe actif similaire à l'ancienne formulation (Stella *et al.*, 1995). La myotoxicité de la chlorpromazine a également été réduite de 45 et 60 % par des formulations de β -cyclodextrines à concentration respectivement uni et bi-molaires par rapport au principe actif (Svendsen O, 1988). En théorie, les β -cyclodextrines ou certains excipients huileux joueraient un rôle protecteur en libérant lentement le principe actif et en limitant le contact direct des cellules avec de fortes concentrations du principe actif comme ce serait le cas avec des excipients aqueux (Svendsen O, 1988).

Des formulations à base de liposomes ont aussi été testées. Les liposomes sont des molécules lipidiques de taille, charge électrique et fluidité variables, et sont composés de substances naturellement rencontrées dans l'organisme (phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, stéarylamine ou cholestérol). Chez la souris, une étude histologique des sites d'injection sur une période de 14 jours a montré que les formulations de métamizole et de chloroquine à base de liposomes entraînaient moins de lésions que les formulations commerciales conventionnelles (Kadir *et al.*, 1992). De manière similaire, chez le rat, la toxicité d'une molécule de la classe des benzodiazépines, la loxapine, formulée dans des liposomes est réduite de 60 % par rapport à la formulation conventionnelle à base de solvants organiques (70 % V/V de propylène glycol et 5 % M/V de polysorbate 80). Elle est quand même encore 2 fois plus irritante que le chlorure de sodium isotonique. Cette réduction de la toxicité musculaire a été attribuée d'abord à la composition chimique de la formulation, à base de molécules théoriquement compatibles avec les membranes et

les protéines musculaires, et à la libération lente du principe actif depuis les liposomes, induisant une exposition lente et progressive des fibres musculaires au principe actif, lui-même toxique lors de contact direct avec les cellules (al-Suwayeh *et al.*, 1996).

Dans le domaine vétérinaire, il est souvent plus commode de disposer de formulations dites « retard » ou à « longue action ». Cependant, la majorité des formulations « retard » induisent des lésions au point d'injection, ce qui est à la base du principe de fonctionnement de ces formulations. Un essai d'utilisation de formulations innovantes à base de microsphères formées par une matrice de polymères biodégradables d'acide lactique et d'acide glycolique (PLAGA) a été réalisé. Un antibiotique hydrophile, la cephradine, a été encapsulé dans cette matrice et administré dans le muscle. Chez le lapin, les lésions sont inférieures à celles induites par la formulation contrôle conventionnelle. L'administration chez le chien a montré que l'antibiotique est libéré à un débit plus lent et pendant une période plus longue qu'avec la formulation conventionnelle (Ustariz-Peyret *et al.*, 1999). L'ensemble de ces caractéristiques semblent prometteuses pour le développement de formulations à base de microsphères.

Une étude pharmacocinétique a été menée chez le rat avec des nanosphères composées de polymères d'acide lactique (PLA) chargées en savoxepine, une molécule neuroleptique. Les résultats ont montré que la libération du principe actif ainsi formulé, administré dans le muscle était prolongée, et entraînait des concentrations plasmatiques stables, peu variables pendant au moins 7 jours, ce qui est intéressant pour les molécules de ce type à faible index thérapeutique. 50 % de la dose administrée avec une formulation conventionnelle est excrétée en moins de 24 h, alors qu'il faut 5.4 jours avec la formulation de nanosphères (Allémann *et al.*, 1994). La publication ne contient pas de données de tolérance locale, cependant supposée correcte comme cela a été montré précédemment avec des microsphères comparables (Ustariz-Peyret *et al.*, 1999).

5. Voie d'administration: Intramusculaire sous-cutanée

Plusieurs études comparatives entre les voies IM et SC ont été réalisées. Ainsi, les deux voies d'administration ont été testées pour une solution de procaine-pénicilline

G chez des bovins âgés d'un an environ. Des dépôts au site d'injection et des lésions hémorragiques et inflammatoires ont été observés et sont plus sévères pour la voie SC par rapport à l'administration de la même dose par voie IM (Korsrud *et al.*, 1993). Cependant, une autre étude a comparé chez de jeunes bovins les voies d'administration IM et SC pour différents produits injectables (solutions vaccinales, vitamine E et sélénium, antibiotiques). Les produits ont été administrés chez les animaux jeunes, à la naissance pour les solutions de sélénium, puis à 2-3 mois ou à 5-6 mois pour les autres produits. Les lésions ont été recherchées après l'abattage, à l'âge de 15-18 mois. La voie SC réalisée dans l'encolure entraîne moins de lésions que la voie IM pour les mêmes produits utilisés : ainsi, une injection IM d'un vaccin heptavalent d'*Haemophilus* dans les muscles de l'encolure a provoqué des lésions dans 80 % des muscles alors qu'aucune lésion musculaire n'a été détectée après administration SC (Van Donkersgoed *et al.*, 2000). Une autre étude menée chez 14 veaux a montré que les paramètres pharmacocinétiques ne variaient pas entre les voies IM et SC, mais que les concentrations d'activité sérique en créatine kinase (CK) ou en aspartate transaminase (AST) semblaient indiquer une meilleure tolérance pour la voie SC par rapport à la voie IM (de Laistre Banting et Fanneau de la Horie, 1987).

Ainsi, les résultats de tolérance locale ne sont pas les mêmes pour les voies IM et SC, mais les conclusions des études comparatives ne sont pas univoques. Même si les lésions semblent parfois plus importantes pour la voie SC, l'impact économique n'est pas le même car le parage à l'abattoir est en général plus facile pour une lésion sous-cutanée, le plus souvent en superficie de la carcasse.

6. Effet de la technique d'injection

La technique d'injection concerne principalement l'hygiène de la préparation du site d'injection et la technique d'injection *sensu stricto*.

Concernant l'asepsie, une étude a comparé les lésions musculaires après administration de vaccins Aujeszky en conditions d'utilisation réelle, chez 732 porcs provenant de 9 élevages, et dans des conditions expérimentales standardisées, où la peau était nettoyée à l'alcool et où les aiguilles utilisées étaient stériles. Des surinfections ont été observés dans 48 % des injections réalisées en conditions

d'utilisation réelle, et des abcès dans 13 % des cas, soit dans 61 % au total des cas de lésions examinés dans l'étude « terrain ». Les germes concernés étaient issus de l'environnement (Actinomycètes), ou étaient des bactéries cutanées (Streptocoques, Corynebactéries). Dans l'étude réalisée en conditions standardisées, quelques lésions de type surinfecté ont été observées à l'histologie, mais aucune bactérie n'a pu être isolée des zones atteintes (Vannier, 1986). Cette étude montre donc l'importance d'une hygiène la plus stricte possible lors de la préparation du site d'injection et du matériel.

Une étude comparative de deux techniques d'injection (technique manuelle classique et injection à l'aide d'un dispositif « lance-fléchettes ») a été réalisée chez 40 jeunes bovins avec une formulation d'oxytétracycline dans l'encolure et la cuisse 28 jours avant abattage. La fréquence d'apparition des lésions est similaire pour les deux techniques, par contre la taille des lésions est supérieure pour les administrations classiques, ceci pouvant être expliqué par une contention plus difficile, même si la pression appliquée était inférieure à la pression provoquée par les fléchettes (Van Donkersgoed *et al.*, 1999). Pourtant, l'utilisation de ce dispositif semble prohibé en Amérique du Nord (Van Donkersgoed *et al.*, 2000).

7. Effet de la vitesse d'injection

L'effet de la vitesse d'injection a été testé chez le lapin par l'administration IM de chlorure de sodium isotonique et d'un neuroleptique, le zuclopenthixol à des vitesses variables (Svendsen O., 1983a). Il n'a pas été montré de différences de lésions après administration de chlorure de sodium à des vitesses de 0.1 et 1.0 ml/sec. Par contre, les lésions provoquées par le zuclopenthixol étaient similaires à 0.3 et 1.0 ml/sec, mais significativement plus importantes après administration à 0.3 ml/sec par rapport aux vitesses les plus faibles, 0.03 et 0.1 ml/sec. Les vitesses d'injection les plus faibles, mais non réalisables en pratique quotidienne, semblent réduire les lésions au point d'injection de manière très limitée (Svendsen O., 1983a). Chez l'homme, la douleur au point d'injection est la même quelle que soit la vitesse d'administration, comme cela a été montré par l'administration IM de 4 ml de chlorure de sodium isotonique en 4 ou en 20 sec (Svendsen O., 1984).

La vitesse d'injection ne semble donc pas avoir de rôle majeur dans la douleur lors de l'administration et dans le développement des lésions au point d'injection.

8. Effet du site d'injection

Chez le lapin, une étude a comparé l'administration de chlorpromazine dans les muscles antérieurs de la cuisse et dans les muscles postérieurs (Bree *et al.*, 1971). Le site d'injection a été dans cette étude un facteur très important du développement lésionnel, avec dans le premier cas un confinement des lésions au point d'injection, alors que l'administration dans les muscles postérieurs de la cuisse (*Gastrocnemius*) a entraîné des lésions beaucoup plus diffuses, provoquant des nécroses cutanées, des atteintes aux nerfs sciatique, tibial et péronier ainsi que paralysies et gangrènes des extrémités distales.

Une étude comparant chez le veau différents sites d'injection pour une formulation longue action d'oxytétracycline (excipient : 2-pyrrolidone) a également montré que les lésions sont plus fréquentes dans les muscles de l'arrière train (muscles glutéal et semi-membraneux) que dans les muscles de l'encolure. Ainsi, 120 jours après une seule administration, des lésions sont encore visibles dans 85 % des muscles semi-membraneux injectés et dans 90 % des muscles glutéaux, alors qu'elles ne sont plus détectables que dans 35 % des muscles de l'encolure (Glock *et al.*, 1995). Ces résultats sont en accord avec une étude plus ancienne réalisée chez des bovins adultes, où les lésions après administration IM de différentes formulations d'oxytétracycline étaient plus importantes dans les muscles de la cuisse que dans les muscles de l'encolure (Petzer *et al.*, 1984).

Seux sites d'administration IM (l'encolure et l'arrière train) ont aussi été testés pour différents produits injectables chez le jeune bovin (Van Donkersgoed *et al.*, 2000). Les résultats montrent qu'en général, l'injection d'un même produit entraîne moins de lésions dans les muscles de l'encolure par rapport aux muscles de l'arrière train : ainsi, l'injection d'un vaccin (*Haemophilus*) a induit des lésions dans 5 % des muscles de l'encolure et dans 29 % des muscles du haut de la croupe, et l'injection d'un vaccin quadrivalent a entraîné des lésions dans 22 % des cas pour les muscles de l'encolure et dans 67 % des cas pour les muscles du haut de la croupe. Selon les produits administrés et les muscles concernés, les pertes économiques ont été estimées jusqu'à 14.53 dollars canadiens par injection. En conclusion, ces résultats

viennent supporter les recommandations du programme de qualité de la viande bovine, c'est à dire qu'il faut privilégier les injections par voie SC, et quand l'IM est nécessaire, ne pas dépasser un volume de 10 mL par site, et pratiquer les administrations plutôt dans le cou que dans les quartiers arrières (Van Donkersgoed *et al.*, 2000).

Chez le cheval, la tolérance locale pour une formulation de phénylbutazone est également meilleure lors d'administration dans l'encolure par rapport aux masses glutéales. Ainsi, la masse de muscle détruit par une administration similaire dans les deux sites a été évaluée à 0.044 ± 0.029 g/kg de poids vif pour l'encolure et à 0.118 ± 0.048 g/kg de poids vif pour les masses glutéales (Toutain *et al.*, 1995).

9. Effet de l'espèce animale

Des différences importantes de tolérance musculaire ont été montrées entre espèces animales. A l'examen anatomo-pathologique des sites d'injection après administration IM de différentes formulations d'oxytétracycline, l'étendue des lésions chez les ovins est très limitée par comparaison avec le porc ou le veau (Nouws J. F. *et al.*, 1990). L'injection IM de chloramphénicol entraîne proportionnellement plus de lésions chez le bovin que chez le rat (Ladage *et al.*, 1979). Ainsi, le volume de la nécrose réellement observée chez la vache après administration de chloramphenicol était proportionnellement supérieur au volume qui avait été prédit suite à l'observation des lésions dans le muscle *Quadriceps femoris* du rat. Un effet bénéfique sur la tolérance locale de l'oxytétracycline a été montré pour la polyvinylpyrrolidone chez les ovins mais pas chez le porc (Ladage *et al.*, 1979).

En conclusion, le degré d'irritation musculaire ne peut pas toujours être extrapolé entre les différentes espèces.

10. Effet de l'âge des animaux

Lorsque les animaux sont destinés à la consommation, un délai d'attente important entre la dernière administration et l'abattage permettrait de diminuer l'impact des lésions. Cependant, même les injections pratiquées longtemps avant la date d'abattage des animaux posent problème aux transformateurs. Ainsi, 12 mois après administration d'une formulation d'oxytétracycline, des lésions sont décelées à

l'abattoir dans plus de la moitié des animaux injectés. Des administrations IM d'antibiotique (formulation longue action d'oxytétracycline), de vitamines AD₃ ou de 2 solutions clostridiales (2 et 5 mL) ont été réalisées dans le muscle semi-membraneux au moment du marquage des veaux, soit à l'âge de 48.3 jours (88.9 ± 18.1 kg) et dans le muscle glutéal médial au moment du sevrage, soit à l'âge de 199.3 jours (242.3 ± 30.1 kg). A l'abattage des animaux, 7.5 et 12 mois après les administrations, des lésions sont détectées pour les 4 produits. Ainsi, des lésions étaient présentes dans 51.2 et 92.3 % des muscles ayant reçu une administration d'oxytétracycline au marquage et au sevrage respectivement. L'incidence des lésions était également très forte pour les 2 solutions clostridiales administrées au marquage dans le muscle semi-membraneux (72.5 et 92.7 % pour les volumes 2 et 5 mL) ou au sevrage dans le muscle glutéal médial (46.3 et 79.5 % pour 2 et 5 mL). L'incidence était plus faible pour la formulation de vitamines (5.3 % pour l'injection pratiquée au marquage et 10.0 % pour l'injection au sevrage). Le point le plus marquant de l'étude est le fait que quelque soit le produit, la masse de muscle retirée lors du parage des lésions est supérieure pour les administrations les plus anciennes, qui ont été réalisées sur des animaux de gabarit plus faible. Ainsi, lors d'induction d'une lésion chez des animaux jeunes, la taille de la zone de muscle atteint peut augmenter proportionnellement au développement musculaire lors de la croissance des animaux (George *et al.*, 1995a; George *et al.*, 1997)

II. Méthodes d'évaluation des lésions

L'évaluation de la tolérance locale des formulations injectables est nécessaire avant leur mise sur le marché. C'est une obligation réglementaire lors de la constitution d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (lignes directrices ou recommandations internationales (FDA-ICH, 1997)).

L'évaluation de la tolérance locale est aussi nécessaire pour mener à bien le développement des produits injectables, afin de choisir la meilleure forme du principe actif et de l'excipient pour obtenir la formulation la moins irritante.

La méthode optimale d'évaluation de la tolérance locale de formulations pharmaceutiques devrait rassembler tous les critères suivants :

- Non invasive, ne nécessitant pas l'euthanasie des animaux testés, et permettant ainsi de comparer différentes formulations sur le même animal
- Quantitative, standardisée, répétable et reproductible
- Facile à mettre en œuvre, permettant le suivi cinétique du développement de la lésion à différents temps après administration IM sur le même animal
- Coût abordable pour une utilisation généralisée

Aucune des méthodes actuellement disponibles ne remplit ces caractéristiques, chacune présentant des avantages et des inconvénients.

A. Méthode anatomo-pathologique

Il s'agit d'une méthode invasive. C'est la méthode la plus simple et encore la plus utilisée actuellement. Le principe repose sur l'administration IM de la formulation testée et le prélèvement du muscle concerné après euthanasie. Le muscle est découpé autour du site d'injection, disséqué, et peut être coupé en tranches d'épaisseur régulière. Les tranches sont soumises à une observation macroscopique et éventuellement à un examen microscopique (histologie). Différents groupes d'animaux sont constitués, permettant d'évaluer la tolérance musculaire à différents temps après l'administration. Ces études peuvent être menées sur espèces de laboratoires et/ou sur les espèces cibles.

En général, les lésions sont mesurées (poids, surface, volume, dimensions maximales...) et classées en fonction de grilles prédéfinies selon des échelles catégorielles. Un exemple d'indexation en fonction du diamètre des lésions chez le porc est donné dans le tableau 2.

Un des principaux avantages de cette méthode est la réalisation possible concomitante des études de résidus pour la détermination du délai d'attente. Ceci concerne uniquement les espèces cibles destinées à la consommation humaine. Pour ces espèces, l'examen anatomopathologique permet également une évaluation directe de l'aspect du muscle du point de vue de la filière boucherie.

Tableau 2 – Indexation chez le porc des lésions au point d'injection suivant leur aspect macroscopique (chiffre romain) et leur taille (lettre), selon Martineau et coll. (Martineau et al., 1980)

Groupe	Aspect
I	Aspect congestif et hémorragique
II	Aspect fibreux et nécrotique mal délimité
III a	Foyers gris-brunâtres d'aspect nécrosé et entourés d'une coque fibreuse
III b	Foyers verdâtres d'aspect nécrosé entourés d'une coque fibreuse
IV	Nodule fibreux blanc nacré, bien délimité

Groupe	Taille
A	Petit foyer de diamètre inférieur à 3 mm
B	Foyer dont la taille est comprise entre 3 et 5 mm
C	Foyer de 5 à 10 mm de diamètre ou éventuellement le long du trajet de l'aiguille
D	Foyer dont la taille est supérieure à 10 mm

Dans l'espèce porcine, par exemple, pour les formulations très utilisées, les coopératives d'élevage réalisent des études internes pour la détermination de « délai d'attente lésion musculaire », qui est le temps d'attente à respecter par les éleveurs pour assurer l'obtention d'une viande d'aspect normal. Pour de nombreuses formulations, les délais d'attente « lésion » définis par chaque coopérative sont de durées supérieures aux délais d'attente réglementaires « résidus ».

Cette méthode d'évaluation est dépendante des temps de prélèvement choisis après l'administration, elle ne permet pas l'appréhension globale de l'évolution du processus lésionnel à moins d'inclure de nombreux lots d'animaux, ce qui est coûteux et peu éthique. Par le nombre très important d'animaux euthanasiés qui sont nécessaires, cette méthode n'est pas à favoriser, notamment pour les études chez les primates et les animaux de compagnie (cheval, chien, chat) où il n'y a pas d'études de résidus. De plus, l'inconvénient majeur des méthodes anatomopathologiques, macroscopiques ou microscopiques, est que les résultats sont qualitatifs ou au mieux semi-quantitatifs. Cette méthode est donc peu puissante pour les études comparatives de la tolérance locale de plusieurs formulations.

B. Imagerie médicale

L'échographie est une méthode non invasive d'imagerie médicale adaptée à l'étude des tissus mous. Chez l'homme, l'échographie a été utilisée dans une étude chez 120 athlètes atteints d'un problème musculaire (Fornage *et al.*, 1983). Une décision opératoire a été prise pour 25 patients, et la chirurgie a confirmé pour 21 d'entre eux le diagnostic échographique. L'échographie semble donc être un outil fiable pour la détection de lésions musculaires et la description de leur nature, y compris des lésions de petite taille.

Chez l'animal, une revue des qualités de l'échographie pour le diagnostic vétérinaire a été réalisée (Cauvin, 1999) : c'est une technologie relativement abordable, l'examen est non invasif, non douloureux, et utilisable sans anesthésie. Les appareils sont légers et permettent un diagnostic immédiat ou la conservation de clichés pour des mesures ultérieures.

L'échographie est un outil également adapté à la mesure des structures anatomiques chez les bovins pour la mesure des organes urinaires (Braun, 1993, 1991) ou de la région ventrale de l'encolure (Braun *et al.*, 1994). L'échographie permet aussi d'évaluer la composition des carcasses avant l'abattage (Hassen *et al.*, 1998) et

l'étendue des dépôts de graisse intramusculaire (Herring *et al.*, 1998). L'échographie a donc été suggérée comme un outil prometteur pour l'évaluation des lésions musculaires iatrogènes. Ainsi, après administration de triméthoprime et sulfadoxine chez 2 brebis, l'apparence en échographie du muscle injecté était très différente de celle du muscle sain, et une corrélation entre les dimensions des lésions mesurées par échographie et les dimensions mesurées directement après abattage a été mise en évidence (Kles *et al.*, 1997). L'échographie permet de visualiser directement la lésion et de mesurer ses plus grandes dimensions ou surfaces. Il est par contre difficile d'obtenir des mesures de volume lésionnel total. Cependant, la méthode permet de suivre l'évolution des sites d'injection au cours du temps sur un même animal en continu ou presque si nécessaire.

C. Evaluation des lésions musculaires par des marqueurs circulants

1. Principe

Lors d'une atteinte cellulaire, avec atteinte primaire ou secondaire de la membrane, des éléments du cytosol sont libérés dans le liquide extracellulaire, puis rejoignent la circulation générale. Ainsi, les marqueurs les plus utilisés sont des enzymes, de spécificité variable pour le muscle strié squelettique, comme par exemple la lactate deshydrogénase (LDH) (Keller, 1974), les aminotransférases (de Laistre Banting et Fanneau de la Horie, 1987; Knirsch et Gralla, 1970) et la créatine kinase. Des dosages des activités enzymatiques spécifiques dans le milieu circulant permettent alors d'évaluer l'atteinte du musculaire.

2. Utilisation de la CK dans l'évaluation des lésions musculaires d'origine iatrogène

La CK est une enzyme formée par l'association de monomères par paires. Les monomères principaux, B et M, sont situés dans le cytosol. Ils forment des dimères d'association BB dans le cerveau, MM dans les muscles striés squelettiques et MB dans le myocarde (Ventura-Clapier, 1998).

La CK MM étant une enzyme présente à de fortes concentrations dans les cellules musculaires striées (muscles squelettiques ou cardiaques). Son apparition dans le

milieu extracellulaire et dans le plasma circulant est un marqueur sensible et assez spécifique d'une atteinte musculaire. Ainsi, le dosage de l'activité CK plasmatique est largement pratiqué en médecine humaine ou animale pour le diagnostic des affections neuromusculaires. Dans ces troubles, une activité CK plasmatique isolée très supérieure aux valeurs usuelles ou à l'activité CK plasmatique basale de l'individu examiné est souvent observée.

a) Approches décrites

Lors d'administrations intramusculaires, plusieurs approches basées sur l'évaluation de la concentration d'activité plasmatique de la CK ont été utilisées pour évaluer l'importance des lésions induites et comparer plusieurs formulations.

- Comparaison avec la valeur basale de la concentration d'activité CK mesurée à un seul temps défini.
- Détermination du pic de concentration d'activité lorsque des prélèvements sériés ont été réalisés. D'après une synthèse bibliographique (Lefebvre HP, 1994), le pic de concentration d'activité survient dans les 24 heures qui suivent l'administration le plus souvent, et son amplitude peut atteindre 62 fois les valeurs de base chez le chien (Lewis et Rhodes, 1978). Le retour des concentrations d'activité aux valeurs basales est observé en général dans les 48 à 96 heures après l'injection, mais peut être plus tardif (Lefebvre HP, 1994).
- Intégration de plusieurs valeurs sériées de concentrations d'activité CK en aire sous la courbe (AUC) en fonction du temps.

Les trois approches ci-dessus permettent, chez le même animal, de comparer plusieurs formulations, mais ne donnent pas une évaluation quantitative de la masse de muscle atteint par l'administration intramusculaire. Une approche plus précise, permise par l'analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique a été proposée (Lefebvre H. P. *et al.*, 1996).

b) Analyse pharmacocinétique

Après libération de la CK par les cellules musculaires atteintes, la CK est absorbée depuis le milieu extracellulaire et transite majoritairement par voie lymphatique vers le compartiment plasmatique (Hsu et Watanabe, 1983). Comme toute molécule endogène ou exogène, la CK est soumise à un ensemble de phénomènes pharmacocinétiques qui incluent principalement la distribution, le métabolisme et l'élimination de l'organisme. Une concentration d'activité mesurée de manière isolée dans le plasma est le résultat d'un équilibre entre « production », c'est-à-dire la libération de la CK depuis les cellules musculaires vers le plasma, et élimination hors de l'organisme. Lorsqu'il n'y a pas de lésion musculaire, la valeur de la concentration d'activité plasmatique de la CK est le résultat du renouvellement physiologique continu des cellules musculaires, en équilibre avec l'élimination de CK hors de l'organisme.

L'analyse pharmacocinétique de la CK plasmatique consiste à évaluer la quantité de CK qui a été absorbée dans le compartiment plasmatique à partir de prélèvements sanguins sériés réalisés après administration IM d'une formulation irritante. Pour cela, il est nécessaire de connaître la clairance totale de la CK plasmatique dans l'espèce animale concernée. Celle-ci peut être déterminée chez l'animal à partir d'une administration IV d'une solution de CK homologue. Elle est faible en général : 0,11 ml/min/kg chez la vache (Lefebvre H. P. *et al.*, 1994), 0,54 ml/min/kg chez le chien (Aktas *et al.*, 1995a), 0,38 ml/min/kg chez le mouton (Verlinde *et al.*, 1996) et à 0,35 mL/min/kg chez le cheval (Toutain *et al.*, 1995).

En complément, une administration IM d'une dose connue de CK permet d'estimer la biodisponibilité musculaire de la CK, c'est-à-dire la proportion F de la dose de CK administrée dans le muscle qui arrive effectivement dans le compartiment plasmatique. La biodisponibilité musculaire de la CK est de 51 % chez la vache (Lefebvre H. P. *et al.*, 1994), 42 % chez le mouton (Verlinde *et al.*, 1996), est comprise entre 25 et 105 % (65 % en moyenne) chez le chien (Aktas *et al.*, 1995a) et 96 % chez le cheval (Toutain *et al.*, 1995). La biodisponibilité réelle est en fait au plus égale à la biodisponibilité mesurée, car la solution de CK exogène administrée dans le muscle peut entraîner la libération de CK endogène depuis le site d'injection.

Les principales étapes de l'approche pharmacocinétique sont décrite ci-dessous :

Première étape : administration intraveineuse de CK (solution homologue) :

Il est possible de préparer une solution concentrée d'activité CK par une technique d'extraction de l'activité CK à partir de muscle squelettique de l'espèce concernée (solution de CK homologue). Une technique d'homogénéisation au Potter dans du chlorure de sodium isotonique (5 mL pour un gramme de muscle), suivie d'une centrifugation et du prélèvement du surnageant a été testée et comparée à d'autres méthodes de préparation (Lefebvre H.P. *et al.*, 1992b).

Après administration, des prélèvements sanguins sont effectués et l'AUC est calculée par analyse non-compartimentale en utilisant la méthode des trapèzes (Gibaldi et Perrier, 1982). La clairance plasmatique totale de la CK (Cl_{tot}) est calculée comme suit :

$$Cl_{tot} = \frac{Dose_{iv,CK}}{AUC_{iv,CK}}$$

Avec $Dose_{iv,CK}$ l'activité CK totale administrée par voie IV, et $AUC_{iv,CK}$ l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations d'activité CK plasmatique en fonction du temps après l'administration du bolus IV de CK.

Seconde étape : administration intramusculaire de CK (solution homologue) :

L'administration IM de la même solution concentrée de CK permet de calculer la biodisponibilité, F de la CK administrée dans le muscle :

$$F = \frac{AUC_{im,CK} \times Dose_{iv,CK}}{AUC_{iv,CK} \times Dose_{im,CK}}$$

Avec $Dose_{iv,CK}$, et $Dose_{im,CK}$ les activités CK totales administrées respectivement par voie IV et IM ; $AUC_{iv,CK}$ et $AUC_{im,CK}$ les AUC de CK en fonction du temps correspondant à chaque administration.

Troisième étape : administration intramusculaire de la formulation à évaluer en tolérance locale :

Trois prélèvements réalisés avant l'administration IM permettent de calculer une activité CK basale moyenne, bruit de fond physiologique correspondant au renouvellement des cellules. Cette moyenne est retranchée des concentrations

d'activité mesurées par la suite, en application du principe pharmacocinétique de superposition (Gibaldi et Perrier, 1982).

Des prélèvements sériés réalisés après l'administration IM permettent de calculer l'AUC en fonction du temps de l'activité CK plasmatique (méthode des trapèzes).

Lors d'une administration IM d'une formulation irritante, la quantité totale de CK qui a été absorbée dans le plasma suite à l'atteinte des cellules musculaires, difficilement mesurable, est égale à la quantité totale de CK qui a été éliminée du plasma, quantité plus aisément appréhendée par l'AUC et la clairance totale.

Ainsi :

Quantité de CK absorbée dans le plasma = Quantité de CK éliminée hors du plasma

$$F \times Q_{CK\text{muscle}} = Cl_{tot} \times AUC_{CK}$$

Avec : F la biodisponibilité de la CK depuis le muscle, $Q_{CK\text{muscle}}$ la quantité totale de CK libérée par le muscle, Cl_{tot} la clairance plasmatique totale de la CK et AUC_{CK} l'aire sous la courbe de la concentration d'activité de la CK plasmatique en fonction du temps.

Alors la quantité totale de CK libérée par le muscle est:

$$Q_{CK\text{muscle}} = Cl_{tot} \times AUC_{CK} \times F^{-1}$$

La masse de muscle M_{muscle} équivalent à la quantité de CK libérée est :

$$M_{\text{muscle}} = \frac{Q_{CK\text{muscle}}}{[CK]_{\text{muscle}}}$$

Avec $[CK]_{\text{muscle}}$ la concentration d'activité CK du muscle normal.

Soit :

$$M_{\text{muscle}} = \frac{Cl_{tot} \times AUC_{CK} \times F^{-1}}{[CK]_{\text{muscle}}}$$

Approche simplifiée

En pratique, lorsqu'il n'est pas possible de réaliser les administrations IV et IM de solution de CK aux animaux testés, on peut limiter les phases animales à l'administration IM des formulations irritantes. Il est possible d'utiliser une approche simplifiée en incluant les paramètres Cl_{tot} , F et $[CK]_{\text{muscle}}$ issus de la bibliographie pour différentes espèces animales. Ainsi, des équations générales ont été proposées

(Lefebvre H. P. *et al.*, 1996). Il suffit d'y inclure les AUC de CK obtenues après l'administration IM des formulations irritantes.

Soit :

$$M_{\text{muscle}} = a \times \text{AUC}_{\text{CK}}$$

Avec a un coefficient déterminé au préalable pour l'espèce animale considérée :

$$a = \frac{\text{Cl}_{\text{tot}} \times F^{-1}}{[\text{CK}]_{\text{muscle}}}$$

Ainsi, les équations qui ont été proposées sont par exemple (Lefebvre HP, 1994) :

$$\text{Chien : } Q \text{ (g.kg}^{-1}\text{)} = 0,30.10^{-6} \times \text{AUC (U.h.L}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Vache : } Q \text{ (g.kg}^{-1}\text{)} = 4,41.10^{-6} \times \text{AUC (U.h.L}^{-1}\text{)}$$

Chez le cheval, l'équation proposée est : $Q \text{ (g.kg}^{-1}\text{)} = 5,52.10^{-6} \times \text{AUC (U.h.L}^{-1}\text{)}$ pour une injection dans les muscles de l'encolure et $Q \text{ (g.kg}^{-1}\text{)} = 5,52.10^{-6} \times \text{AUC (U.h.L}^{-1}\text{)}$ pour les muscles de la croupe (Lassourd, 1995).

c) Précautions

Pour s'assurer de l'origine uniquement traumatique et non d'une origine systémique de l'augmentation d'activité CK, il faut évaluer l'effet sur la concentration d'activité CK plasmatique d'une administration intraveineuse isolée de la formulation testée. Il est également possible d'exprimer le rapport entre l'AUC de la CK plasmatique obtenue après l'administration IM de la formulation testée et l'AUC de la CK plasmatique obtenue après l'administration IV, comme cela a été réalisé lors d'une étude de tolérance de l'oxytétracycline chez le chameau (Oukessou *et al.*, 1992).

Lors de l'administration intramusculaire d'un soluté de chlorure de sodium isotonique chez le chien (Aktas *et al.*, 1995a) et la vache (Lefebvre H. P. *et al.*, 1994), l'élévation de l'activité CK plasmatique n'est pas significative ; l'influence du traumatisme mécanique de l'aiguille est négligeable devant le rôle de la formulation elle-même.

III.Aspects mécanistiques du développement des lésions musculaires iatrogènes

A. Développement des lésions musculaires iatrogènes

A partir de l'observation d'une lésion musculaire iatrogène, nous essaierons de dégager puis de résumer les mécanismes physiopathologiques les plus vraisemblablement impliqués, depuis le niveau tissulaire jusqu'au niveau cellulaire.

1. Description d'une lésion musculaire iatrogène

La description anatomopathologique macroscopique des tissus musculaires lors de lésions iatrogènes est très documentée dans la littérature. Les lésions les plus fréquemment observées ont été rapportées par Lefebvre (Lefebvre HP, 1994) et Svendsen (Svendsen O, 1988) :

- Coloration anormale, allant successivement du rouge au gris-jaunâtre, brun-jaunâtre puis brun-noirâtre, depuis le moment de l'injection jusqu'à l'abattage de l'animal.
- Hémorragie focalisée
- Lésions de taille variable avec des zones grisâtres et hémorragiques
- Nécrose musculaire irrégulière avec des limites hémorragiques
- Nécrose musculaire massive, avec un pourtour hémorragique bien délimité.

Les critères de classification des lésions en observation macroscopique et en histologie ont été résumés précédemment sous forme de tableaux (Bost, 1994a; Lefebvre HP, 1994). Les critères macroscopiques et microscopiques retenus pour l'évaluation des lésions chez le porc sont indiqués dans les tableaux 3 et 4.

D'après ces observations macroscopiques et histologiques, les aspects hémorragiques, oedémateux et nécrotiques sont constamment observés. Il est vraisemblable que des phénomènes inflammatoires et vasculaires interviennent dans le développement de ce type de lésions musculaires iatrogènes. Au niveau cellulaire, nous verrons ensuite les mécanismes lésionnels impliquant le calcium.

Tableau 3 - Indexation des lésions musculaires macroscopiques chez le porc selon Nouws (Nouws J. F., 1984), d'après Lefebvre (Lefebvre H. P. et al., 1996).

Index	Aspect macroscopique
+/-	Irritation modérée ou absente ; léger œdème ou hémorragie ; difficilement identifiable
+	Irritation modérée ; œdème et hémorragie ; absence d'œdème ; aire irritée inférieure à 3 x 5 cm ²
++	Irritation importante ; hémorragie ; petits abcès avec nécrose ; aire irritée inférieure à 4 x 7 cm ²
+++	Irritation sévère ; abcès avec nécrose entouré par du tissu fibreux ou tissu fibreux abondant avec traces hémorragiques sans abcès ; aire irritée inférieure à 5 x 8 cm ²
++++	Irritation très importante ; abcès avec nécrose, entouré d'œdème, d'hémorragie et de tissu fibreux ; aire irritée supérieure à 5 x 8 cm ²

Tableau 4 - Indexation des lésions histologiques chez le porc selon Rasmussen et Svendsen (Rasmussen et Svendsen, 1976), d'après Lefebvre (Lefebvre H. P. et al., 1996).

Index	Aspect macroscopique
1	Aire de nécrose musculaire entourée par une zone démarquée fibroblastique et histiocytaire avec des cellules géantes à corps étranger et des fibres légèrement calcifiées
2	Aire de nécrose des tissus musculaire et adipeux sous-cutané entourée par une zone démarquée fibroblastique et histiocytique. Formation de poches dans la zone sous-cutanée affectée
3	Zone de tissu cicatriciel contenant des îlots de fibres nécrosées avec quelques cellules géantes à corps étrangers et fibres à calcification marquée
4	Augmentation du nombre de cellules interstitielles
5	Non identifiée

2. Mécanismes inflammatoires de lésion tissulaire

a) Définition de l'inflammation

L'inflammation est un complexe physiopathologique qui est défini sur le plan clinique par les termes « *rubor et tumor cum calore et dolore* » (Celse, -30 à 38 ap JC), soit « rougeur et gonflement avec chaleur et douleur ». En effet, lors d'une inflammation cutanée, sous-cutanée ou musculaire, la peau apparaît rouge, elle a un aspect congestionné, de volume augmenté, la zone est plus chaude et il y a une douleur au toucher. La réaction inflammatoire fait intervenir de nombreux processus intégrés, neurologiques et vasculaires qui sont régulés par voie humorale et cellulaire avec de nombreuses interrelations (Laduron, 1998).

Schématiquement, la réaction inflammatoire se déroule en trois phases principales. La figure 4 est une représentation schématique et en grande partie hypothétique du cas particulier de processus inflammatoire qui survient lors de lésion musculaire iatrogène.

1/ Phase aiguë (premières heures):

Elle est précoce et transitoire. Elle est déclenchée par des neuromédiateurs et des médiateurs vasoactifs (substance P, Prostaglandines, leucotriènes, histamine, sérotonine ...). Cette phase est caractérisée principalement par des événements vasculaires, avec des vasodilatations, plus ou moins précédées de phénomènes de vasoconstriction. C'est une période de souffrance des tissus par hypoxie ou défaut nutritionnel. Il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire et une collection de liquide d'œdème en raison de la pression hydrostatique. Les systèmes de la coagulation sont activés, conduisant à de la fibrine et des fibrinopeptides. La fibrinolyse est aussi activée, ce qui entraîne l'activation du complément.

Parallèlement, il peut y avoir une augmentation des concentrations plasmatiques en protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Acute Phase Proteins), comme l'haptoglobine, la protéine C réactive ou l'orosomucoïde. Elles sont synthétisées principalement par le foie en réponse à des stimulations à distance par des médiateurs humoraux (IL1, IL6, TNF).

2/ Phase subaiguë (environ 24 à 48 heures) :

Elle est caractérisée par l'intervention de cellules de l'inflammation. Les cellules polynucléaires neutrophiles (PNN), monocytes et lymphocytes entrent en interaction avec les cellules endothéliales de la zone atteinte par signalisation cellulaire. Puis les PNN adhèrent à ces cellules par l'intermédiaire de molécules de surface, les adhésines (intégrines et sélectines) exprimées en surface des cellules. C'est l'étape de margination. Il y a ensuite diapédèse, c'est-à-dire que les PNN vont se faufiler par chimiotactisme entre les cellules endothéliales pour s'infiltrer dans les tissus sous-jacents. Les cellules inflammatoires jouent alors un rôle de détersion du foyer. (Voir figure 5)

3/ Phase chronique de réparation du tissu (quelques jours à un mois) :

Dans le tissu musculaire, les cellules satellites sont activées, donnent des myoblastes qui se multiplient activement et s'alignent dans le foyer lésionnel. Il y a ensuite fusion des myoblastes en myotubes, cellules polynuclées, présentant des noyaux centraux. Les myotubes se différencient alors en myocytes, cellules musculaires différenciées, avec margination des noyaux.

Il y a prolifération des fibroblastes, synthèse de collagène et de protéoglycanes et comblement cicatriciel du foyer inflammatoire.

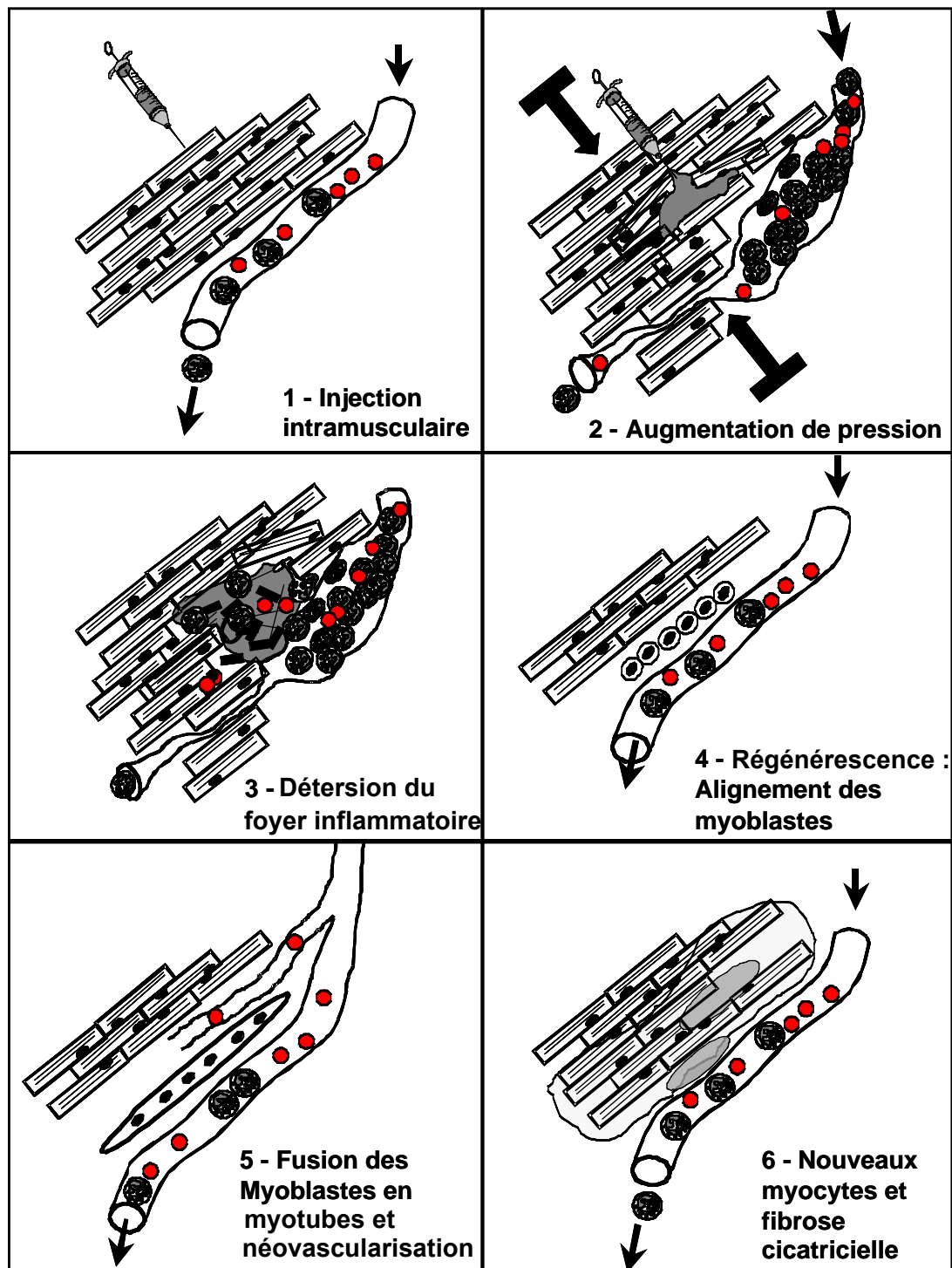


Figure 4 – Représentation schématique de la réaction inflammatoire musculaire et de la cicatrisation. Schémas 1 à 3 : stades des premières 48 h ; schémas 4 à 6 : stades des premiers jours à 1 mois.

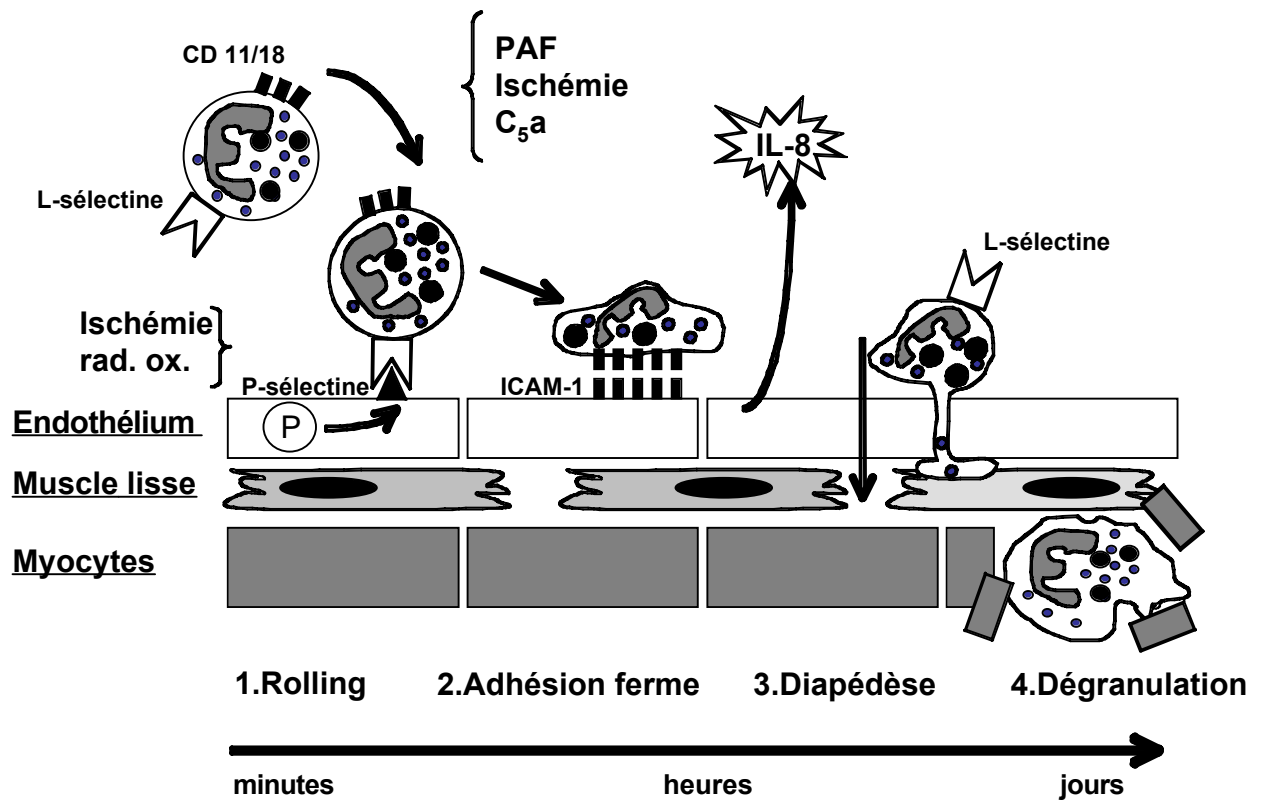


Figure 5 – Interaction entre les cellules endothéliales et les cellules polynucléaires neutrophiles dans le muscle squelettique

b) Cyclooxygénases et prostanoides

(1) Intervention dans la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire met en jeu des médiateurs biologiques, notamment les prostanoïdes. Les prostanoïdes sont le résultat de l'activation de la « cascade de l'acide arachidonique » par différentes enzymes dont les COX (voir figure 6).

Il existe au moins deux isoenzymes, COX-1 et COX-2. Le premier isoenzyme, COX-1, a été identifié il y a une trentaine d'années, en même temps que le mode d'action des Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) était découvert (Vane, 1971). COX-1 est une enzyme constitutive, présente dans les tissus à l'état physiologique. Les prostanoïdes produits par COX-1 sont dits cytoprotecteurs car ils sont impliqués dans le fonctionnement et dans l'homéostasie de l'organisme. Ils régulent en particulier la muqueuse du tractus gastro-intestinal, les endothéliums vasculaires (PGI_2), le débit sanguin rénal (PGE_2) et les plaquettes (TXA_2). COX-2 a été identifiée il y a une dizaine d'années. Sa séquence d'acides aminés a un fort pourcentage d'homologie avec celle de COX-1, mais elle est surtout présente dans les foyers inflammatoires. C'est l'isoenzyme COX-2 dont la synthèse est induite par des cytokines lors de réactions inflammatoires pathologiques. Elle est surtout synthétisée par les cellules de l'inflammation (macrophages, etc...). Les prostanoïdes issus de COX-2, principalement PGE_2 , peuvent entraîner des inflammations très importantes. D'autre part, plusieurs études de biologie moléculaire ou de physiologie et pharmacologie ont montré que COX-2 est significativement exprimée dans de nombreux tissus où elle a un rôle important dans l'homéostasie (rein, cellules endothéliales, ovaires, utérus, os et système nerveux central) (Wallace, 1999).

Très schématiquement, il est possible d'inhiber sélectivement COX-1 et/ou COX-2 en utilisant des molécules AINS, ce qui limite la production de prostanoïdes, mais n'empêche pas la production de leucotriènes par la voie de la lipo-oxygénase. Le rapport des indices d'inhibition pharmacologique des deux isoenzymes permet de comparer l'action des différents AINS.

(2) Intervention des cyclooxygénases dans le muscle

De nombreux travaux ont rapporté la présence des cyclooxygénases dans le muscle lisse ou dans le muscle cardiaque, mais très peu d'études mentionnent la présence

des cyclooxygénases spécifiquement dans le muscle strié squelettique. Pourtant, les affections musculo-squelettiques sont parmi les indications les plus fréquentes des prescriptions d'AINS.

Une induction musculaire de COX-2 a été mise en évidence dans un modèle classique d'inflammation aiguë obtenue par administration intraplantaire de carragénine (Nantel *et al.*, 1999). L'induction d'ARN messagers, de la protéine et des principaux produits de COX-2, les PGE₂, était détectable dans les 3 premières heures. Une faible dose de carragénine entraînait une expression des protéines COX-2 uniquement dans les couches épidermiques, alors qu'une dose importante de carragénine induisait les COX-2 également dans le muscle squelettique sous-jacent et dans les cellules inflammatoires. Un traitement par l'indométhacine (AINS mixte) réduisait l'induction des ARN messagers de COX-2. Les auteurs suggèrent l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif par les prostanoïdes (PGE₂) sur l'induction de COX-2 (Nantel *et al.*, 1999).

Dans une revue sur la régulation du débit sanguin dans le muscle strié squelettique, Lash indique le rôle des prostaglandines, et plus particulièrement PGF_{1α} et PGE₂ dans la vasodilatation de la microcirculation musculaire. Ainsi, les prostaglandines peuvent être produites en réponse à des hypoxies locales ou à une augmentation de la vitesse du sang dans les vaisseaux, phénomènes que l'on rencontre durant les contractions musculaires et l'hyperémie d'exercice. L'administration d'indométhacine, un AINS mixte, réduit ainsi les hyperémies de 25 à 50 %. Il a aussi été montré que la production de prostaglandines augmentait durant les contractions musculaires (Lash, 1996).

Selon Mishra et Friden, les AINS sont souvent prescrits en chirurgie orthopédique pour l'amélioration des lésions d'ostéoarthrose dégénérative, des lésions des tissus mous et des douleurs aiguës (Mishra *et al.*, 1995). Dans un modèle de lésion musculaire par contraction excentrique de l'extenseur long des doigts chez le lapin, le traitement par le flubiprofène pendant 7 jours améliore significativement les paramètres fonctionnels du muscle au 3^{ème} et au 7^{ème} jour après induction de la lésion, mais pourtant diminue les propriétés contractiles musculaires au 28^{ème} jour après l'induction de la lésion par rapport aux animaux non traités (Mishra *et al.*, 1995).

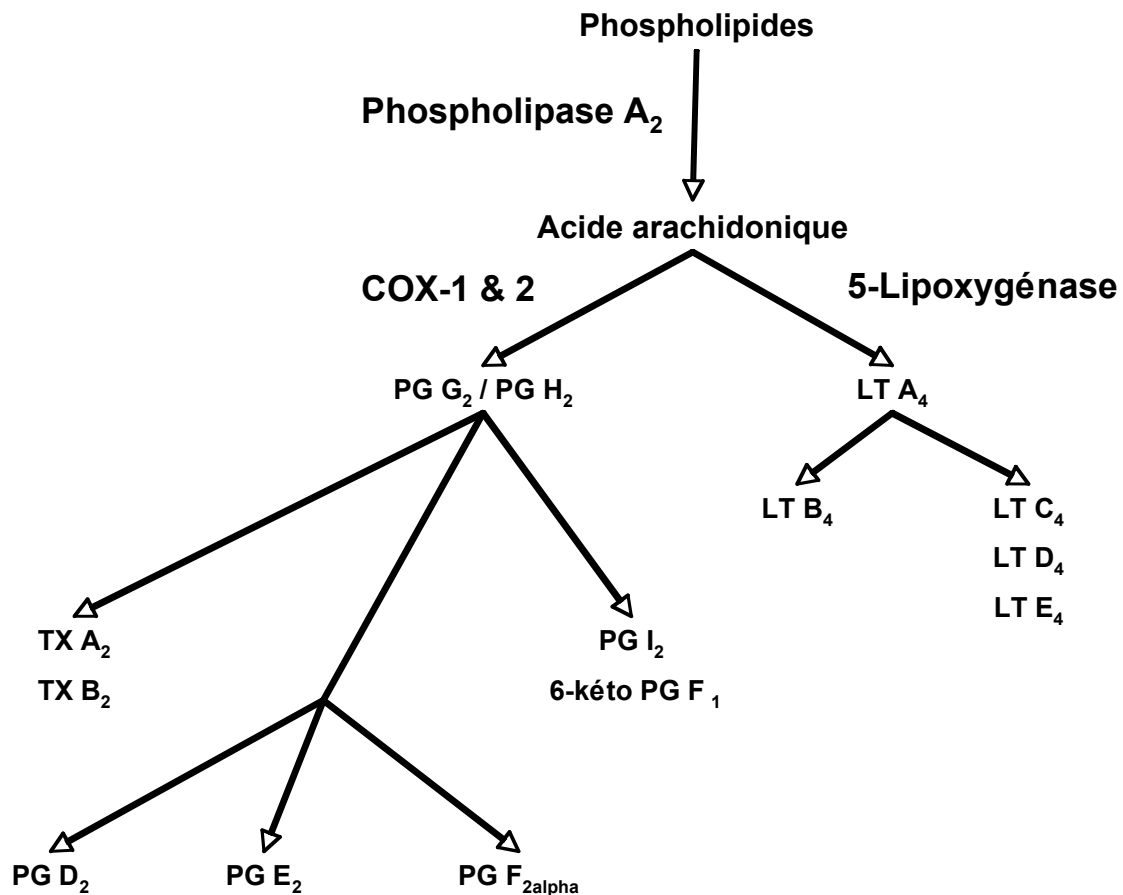


Figure 6 – Synthèse des prostanoïdes et leucotriènes à partir de l'acide arachidonique, voie des cyclooxygénases.

Le point de départ de la synthèse des prostanoïdes sont les molécules de phospholipides qui composent les bicouches des membranes cellulaires. Les phospholipases (phospholipase A₂) catalysent la réaction de transformation des lysophospholipides en acide arachidonique et en mono ou bi-glycérides. Les cyclooxygénases (COX), ou Prostaglandines G/H-synthases sont des enzymes clé de cette cascade de l'acide arachidonique, car elles catalysent les premières réactions biochimiques qui conduisent aux différents prostanoïdes. Les COX sont des glycoprotéines membranaires qui présentent deux fonctions catalytiques. Elles convertissent tout d'abord l'acide arachidonique en endoperoxyde cyclique (PGG₂), puis c'est la fonction peroxydase qui transforme PGG₂ en PGH₂, un intermédiaire instable (Smith et al., 1996) qui donne les autres prostaglandines (PG) et Thromboxanes (TX). Il existe une autre voie enzymatique à partir de l'acide arachidonique qui conduit aux Leucotriènes (LT).

Chez le rat, la régénération du muscle *Tibialis anterior* après une lésion provoquée par étirement contrôlé a été suivie avec ou sans traitement anti-inflammatoire par le piroxicam. Deux jours après l'induction de la lésion, tous les rats présentaient une diminution de la résistance musculaire à la traction, plus marquée dans le groupe non traité par rapport au groupe traité par le piroxicam (respectivement 25.7 % vs 40.8 % de la résistance du muscle témoin controlatéral) (Almekinders et Gilbert, 1986). Cependant, 2 jours plus tard, la résistance du muscle des animaux traités continuait de diminuer alors qu'elle remontait vers de valeurs normales chez les animaux non traités. L'analyse histologique des muscles montrait également une réponse inflammatoire et une régénération musculaire retardées chez les animaux traités en comparaison avec les non traités (Almekinders et Gilbert, 1986).

L'administration intramusculaire de marcaïne (agent anesthésique local), de solutions de BaCl_2 ou de notexine (toxine de venin de serpent) permet d'induire une dégénérescence musculaire expérimentale, suivie de régénération. Ainsi, l'injection de BaCl_2 permet d'induire une lésion nécrotique des cellules musculaires sans destruction de la membrane basale. Le volume des muscles lésés retourne à la normale à partir du 12^{ème} jour après l'injection (McArdle *et al.*, 1994). Dans ce modèle, les cellules musculaires en cours de régénération libèrent des PGE_2 lors d'activité contractile ou de mise en présence d'un traitement ionophore calcique, contrairement au muscle normal pour lequel il n'y a pas de modification (McArdle *et al.*, 1994). D'autres études sur les cyclooxygénases et les prostaglandines du muscle squelettique ont été menées par le groupe de Vandeburgh *et al.* sur des cellules musculaires striées bien différenciées (Vandeburgh *et al.*, 1995). En effet, une couche de cellules musculaires squelettiques de grandes dimensions multinucléées en proportion majoritaire peut être obtenue en 7-8 jours par stimulation mécanique sur un modèle constitué à partir de myoblastes isolés du muscle *pectoralis* d'embryons de poulets (Vandeburgh *et al.*, 1989). Les prostaglandines PGE_1 , PGE_2 et $\text{PGF}_{2,\alpha}$ principalement sont des régulateurs de la croissance musculaire durant le développement et chez l'animal adulte (Vandeburgh *et al.*, 1995). Dans le modèle *in vitro*, lorsque les cellules sont bien différenciées et lors de l'étirement mécanique des couches de cellules, l'augmentation de $\text{PGF}_{2,\alpha}$ dans le milieu de culture est le signe de la stimulation de l'activité cyclooxygénase dans le muscle. C'est l'isoenzyme COX-2 qui est mise en évidence dans les cellules musculaires, en concentration élevées en comparaison avec les concentrations observées dans les fibroblastes

voisins. L'isoenzyme COX-1, par contre, n'est que peu ou pas du tout détecté dans les fibres musculaires dans ce modèle (Vandenburgh *et al.*, 1995). Une étude précédente utilisant le même modèle cellulaire avait déjà montré qu'il y avait aussi activation des phospholipases cellulaires A2 et D par stimulation mécanique, conduisant à des concentrations intracellulaires plus élevées en diacylglycérol et en acide arachidonique, ce dernier étant le précurseur des prostaglandines (Vandenburgh *et al.*, 1993).

L'ensemble de ces éléments suscite une implication des COX, à la fois dans la réponse aiguë du muscle strié squelettique à une agression que pendant la régénération tissulaire.

c) Inflammation neurogénique

(1) Description de l'inflammation neurogénique

L'inflammation neurogénique est un processus inflammatoire complexe le plus souvent aigu mais parfois également chronique. Une revue détaillée a été réalisée par ailleurs (Laduron, 1998). La particularité de cette inflammation est qu'elle implique d'autres supports que le tissu concerné et les cellules inflammatoires classiques. En effet, la mise en place du processus se fait à partir de nocicepteurs qui sont localisés dans les tissus. Lors de stimulation nociceptive par brûlure, traumatisme cutané, stimulus chimique ou pression, les fibres nerveuses centripètes (fibres sensorielles de type C, fines et non myélinisées, conduisant lentement l'influx nerveux) sont activées et transmettent l'information vers les structures nerveuses centrales. Si le stimulus est suffisamment important, une stimulation efférente ou descendante des mêmes fibres C est déclenchée jusqu'à la zone stimulée initialement. A cet endroit, des neuropeptides sont libérés : substance P, mais aussi la neurokinine-A (NKA) et le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP). Ces médiateurs entraînent une vasodilatation artérielle importante et un passage du plasma dans l'interstitium, puis un afflux de cellules inflammatoires. La dégranulation des mastocytes, par exemple, qui libèrent des amines biogènes comme l'histamine, est activée par la substance P. La particularité de l'inflammation neurogénique est que cette réaction, locale, peut être amplifiée par les structures nerveuses, ce qui est

appelé le « réflexe d'axone ». Il s'agit de la stimulation des fibres sensorielles périphériques qui étendent la réaction inflammatoire dans le temps et dans l'espace, libérant des neuromédiateurs dans les zones voisines de la zone stimulée initialement. Les fibres sensorielles C peuvent donc présenter des potentiels d'action à la fois dans le sens centrifuge et dans le sens centripète. La substance P est synthétisée dans le corps cellulaire des neurones des fibres C, situé dans le ganglion rachidien. La substance P est transportée vers les terminaisons nerveuses par un système de vésicules et de microtubules.

Les protéines Fos sont surexprimées dans les neurones post-synaptiques de la moelle épinière dans les 2 heures qui suivent un stimulus périphérique douloureux chez le rat (Doyle et Hunt, 1999). Ainsi, une expression des récepteurs NK-1 à la substance P dans différentes couches de la moelle épinière a été mise en évidence par immunohistologie en réponse à une administration IM de produit irritant dans le muscle *Gastrocnemius* (30 µL d'une solution d'huile de moutarde à 10 %). De plus, dans cette étude, une co-localisation histologique a été également montrée pour une partie des neurones, exprimant à la fois C-fos et les récepteurs NK-1 à la substance P (Doyle et Hunt, 1999). L'inflammation de type neurogénique peut donc être observée dans le muscle strié squelettique.

(2) Modulation de l'inflammation neurogénique

La modulation de l'inflammation neurogénique s'obtient en bloquant l'action de la substance P, ce qui est possible à deux niveaux :

- Blocage pré-synaptique : Il s'agit d'utiliser des molécules qui empêchent la libération de la substance P contenue dans les vésicules des extrémités des fibres sensorielles C. La colchicine, par exemple, inhibe le transfert microtubulaire de la substance P vers la synapse. De manière également non spécifique, les substances opiacées peuvent inhiber la libération de la substance P au niveau pré-synaptique.
- Blocage post-synaptique : Il s'agit de stimuler la dégradation de la substance P après sa libération dans l'espace synaptique, ou d'inhiber son action, c'est à dire sa fixation sur les récepteurs NK-1 (Neurokinine-1) situés sur les cellules effectrices (Andrews *et al.*, 1989), principalement sur les cellules endothéliales. Après utilisation de substances peptidiques synthétiques, peu sélectifs, des antagonistes non peptidiques ont été développés dans les

années 1990. Ces antagonistes se fixent sur les récepteurs post-synaptiques NK-1 et empêchent l'action de la substance P. Les corticoïdes sont également des inhibiteurs de l'inflammation neurogénique qui agiraient en inhibant l'expression des récepteurs NK-1.

3. Le phénomène d'ischémie-reperfusion musculaire

L'ischémie-reperfusion est une entité physiopathologique décrite dans de nombreux tissus et différentes situations cliniques (transplantation d'organes, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, etc...). Dans les 10 à 20 dernières années, ce mécanisme a fait l'objet de nombreux travaux expérimentaux multidisciplinaires impliquant des techniques de physiologie intégrée, de biologie cellulaire, biochimie, biologie moléculaire et pharmacologie.

a) Aspect mécanistique général

La réduction ou l'arrêt du débit sanguin (ischémie) est suivie par la restauration de l'apport vasculaire (reperfusion) (voir la figure 7). De manière paradoxale à première vue, c'est surtout lors de la reperfusion du tissu que les lésions sont visiblement induites. Le processus mis en jeu est multifactoriel (Rubin *et al.*, 1996). La phase d'ischémie entraîne principalement un passage à un métabolisme de type anaérobie par défaut d'apport en oxygène. Une hypoxie et une acidose se développent dans les cellules musculaire et les cellules endothéliales tandis que la concentration en ATP chute, entraînant des dérèglements de l'homéostasie ionique (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ principalement) par arrêt des pompes membranaires dépendantes de l'ATP (Harris et Granger, 1997). Dans les cellules endothéliales, il y a production de radicaux oxydants, de médiateurs pro-inflammatoires (PAF ou facteur activateur des plaquettes), et surcharge calcique. La synthèse d'endothéline et de molécules d'adhésion des neutrophiles par l'endothélium (sélectines, et immunoglobulines ICAM1, ICAM2) est alors activée. Les cellules polynucléaires neutrophiles exprimant les molécules d'adhésion complémentaires (sélectine-L et intégrines CD11/CD18) s'agrègent et entrent en interaction avec les cellules endothéliales lors de la reperfusion, et perturbent la microcirculation (Boyle *et al.*, 1997; Harris et Granger, 1997 ; Kearns *et al.*, 2001). Cette perturbation de la microcirculation dans certaines zones (appelées zones de « no-reflow ») prolonge la durée de l'ischémie et

augmente la sévérité des lésions dans les zones affectées (Herbert *et al.*, 2001). Les neutrophiles déversent des enzymes protéolytiques (élastases, glucosaminidases, glucuronidases, myéloperoxidases, ...) qui détruisent la barrière endothéliale puis les cellules musculaires après passage des neutrophiles hors de la circulation (Weiss, 1989). Indépendamment du rôle des neutrophiles, l'activation du complément (complexe d'attaque des membranes) participe au déclenchement des lésions observées à la reperfusion du muscle (Kyriakides *et al.*, 1999).

Dans le muscle squelettique, l'ischémie-reperfusion est principalement rencontrée en traumatologie lors de chirurgie orthopédique ou vasculaire, de compression musculaire par écrasement, de thrombo-embolie des membres inférieurs ou lors de syndrome aigu des loges musculaires (Herbert *et al.*, 2001). Seul ce dernier sera décrit ici.

b) Syndrome des loges musculaires

Le syndrome des loges ou des compartiments musculaires est surtout décrit en médecine du sport. Les faisceaux musculaires sont entourés et cloisonnés par des fascias, qui sont des enveloppes conjonctives peu extensibles. L'expansion de la masse musculaire est limitée anatomiquement dans le compartiment ou la « loge » délimitée par les fascias.

Ce syndrome repose sur un conflit entre la taille du contenant et le volume du contenu : Lors d'exercice musculaire intense ou d'inflammation avec œdème et hémorragie, des augmentations de la pression intramusculaire sont constatées (Barlow et Willoughby, 1992). Ces surpressions entraînent une réduction du débit sanguin capillaire qui devient insuffisant pour maintenir la viabilité du tissu (ischémie). Le défaut d'apport nutritionnel et la compression peuvent donner lieu à des lésions ou nécroses des muscles ou des structures voisines (peau, structures nerveuses). Le syndrome doit être diagnostiqué très tôt par la mesure des pressions dans les compartiments musculaires, car il peut entraîner des lésions irréversibles et des contractures très douloureuses.

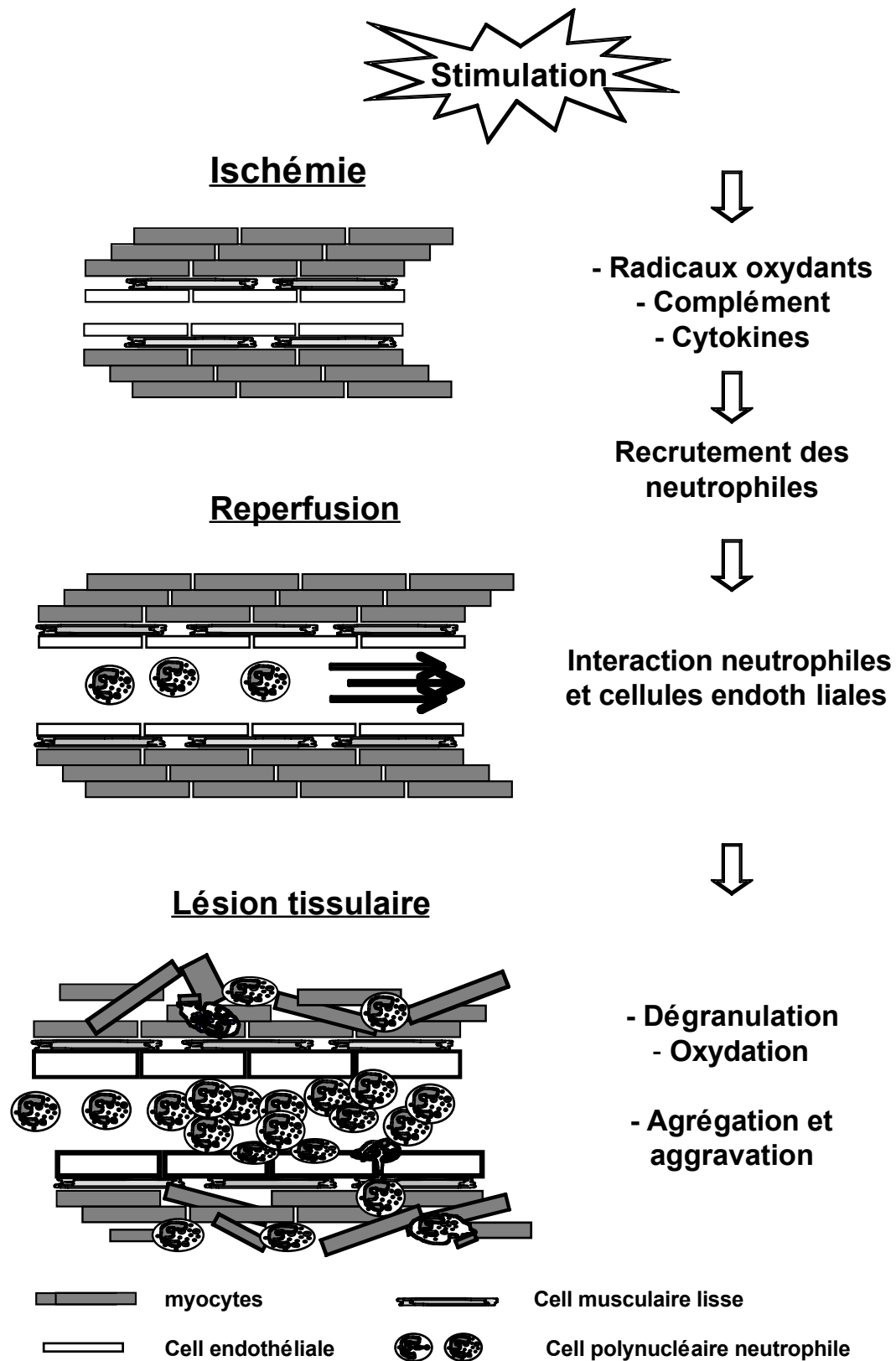


Figure 7 – Représentation schématique de la cascade réactionnelle de l'ischémie-reperfusion musculaire

Lors d'administration IM, il est vraisemblable que le muscle soit soumis à un syndrome des loges pouvant conduire à des lésions de type ischémie-reperfusion. En effet, l'injection d'une formulation plus ou moins visqueuse peut entraîner une compression du muscle et donc des capillaires intramusculaires, avec une amplification éventuelle par des contractions musculaires cloniques.

Dans les lésions musculaires iatrogènes, l'hypothèse de la participation d'une ischémie a d'ailleurs été formulée très tôt alors qu'un œdème et des cellules inflammatoires étaient observées suite à l'administration IM d'une formulation à base de bupivacaïne dans le muscle (Hall-Craggs, 1974). La mise en évidence d'un phénomène d'ischémie-reperfusion, pour laquelle de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été évaluées (Rubin *et al.*, 1996), permettrait d'envisager des moyens pour améliorer la tolérance locale des formulations à usage intramusculaire.

4. Rôle du calcium intracellulaire

L'implication du calcium intracellulaire dans les lésions musculaires a été étudiée dans plusieurs situations telles l'exercice physique soutenu, l'ischémie du myocarde, les dystrophies musculaires et la toxicité locale des venins ou des excipients pharmaceutiques. Les lésions induites par un exercice musculaire sont déclenchées par la perte de l'homéostasie calcique et en particulier l'augmentation du calcium intracellulaire (Armstrong, 1990). Dans des muscles isolés soumis à la toxicité directe du propylène glycol, il a été montré que les lésions et l'efflux de créatine kinase hors des cellules sont associés à une mobilisation intracellulaire du calcium plutôt qu'à une lésion directe du sarcolemme (Brazeau et Fung, 1990).

Le calcium intracellulaire est un activateur des phospholipases A2. L'activité augmente en fonction de la concentration en calcium. Même des élévations mineures mais rapides de la concentration cytosolique du calcium peuvent activer les phospholipases, mais aussi des protéases dépendantes du calcium qui entraînent des modifications et des fragilisations de la structure membranaire (Duncan et Jackson, 1987 ; Schmidt et Schmidt, 1987). L'augmentation de la concentration du calcium cytosolique est normalement réversible par des mécanismes de pompage ATP-dépendants ou par la séquestration du calcium dans le réticulum ou les mitochondries. L'efflux d'enzymes et la mort cellulaire surviennent après l'épuisement des réserves énergétiques de la cellule (Schmidt et Schmidt, 1987). Dans une étude

sur la toxicité musculaire d'un venin de serpent (*Bothrops asper*), une toxine à activité phospholipase A2 a été isolée. Cette toxine induit des lésions musculaires importantes après administration IM, en affectant initialement la membrane plasmique. Les événements faisant suite à cette stimulation initiale ont été décrits chez la souris après administration expérimentale (Gutierrez *et al.*, 1990) : Les lésions membranaires permettent un influx calcique dans les cellules qui entraîne une hypercontraction des myofibrilles. Entre 3 et 6 h après l'injection IM, certains constituants de la structure myofibrillaire, comme l'alpha-actinine et la desmine, sont détruits par protéolyse sélective, notamment par une « protéase neutre activée par le calcium » (CANP ou calcium-activated neutral protease). La dégradation de ces éléments nécessaires à la contraction induit par suite la relaxation des myofilaments. Dans les heures qui suivent (24 à 72 h), il y a dégradation générale des myofibrilles par l'action de protéases issues des cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages) qui affluent dans les zones nécrosées (Gutierrez *et al.*, 1990).

Les anesthésiques locaux tels la bupivacaïne, la mepivacaïne, la lidocaïne ou la procaine induisent aussi des nécroses musculaires importantes. La chronologie des événements a été bien décrite pour la bupivacaïne chez le rat (Nonaka *et al.*, 1983), et semble comparable à celle qui fait suite à la myotoxicité des venins. L'accumulation intracytoplasmique de calcium par entrée du liquide extracellulaire semble être au centre du mécanisme myotoxique. L'entrée du calcium peut-être directe, par simple lyse de la membrane par la bupivacaïne, mais *in vitro*, la bupivacaïne inhibe la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Ce dernier mécanisme, indirect, augmentant la concentration cytoplasmique en calcium interfère avec la fonction musculaire et conduit secondairement à la fragilisation de la membrane et l'entrée massive de liquide extracellulaire dans le cytoplasme (Nonaka *et al.*, 1983). Une revue sur la myotoxicité des anesthésiques locaux montre que seulement les myocytes matures, multinucléés, sont sensibles à la toxicité des anesthésiques locaux (Hogan *et al.*, 1994) ; les cellules satellites ne présentant pas de système membranaire interne capable de séquestrer le calcium ne sont pas atteintes (Hall-Craggs, 1980). Le vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques, prévient la myotoxicité des anesthésiques locaux (Benoit *et al.*, 1980), mais seulement à des concentrations qui inhibent, en plus des canaux calciques du sarcolemme, ceux qui sont intracellulaires sur le réticulum sarcoplasmique (Hogan *et al.*, 1994).

L'administration de dantrolène (un inhibiteur spécifique des récepteurs à la ryanodine) réduit l'élévation de l'activité plasmatique de créatine kinase chez le rat à l'exercice (Amelink *et al.*, 1990), et lors de prélèvement sanguins répétés chez le lapin (Lefebvre H. P. *et al.*, 1992a). Le dantrolène prévient aussi les lésions musculaires en conservant principalement l'ultrastructure et l'apparence du muscle, notamment lors d'ischémie-reperfusion expérimentale (4h d'ischémie et 1h de reperfusion) chez le lapin (Klenerman *et al.*, 1995). Le dantrolène agit par inhibition de la sortie des ions calciums depuis le réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme (Paul-Pletzer *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 1986).

5. Evolution chronique : régénération musculaire

Après la phase aiguë pour laquelle nous avons passé en revue les différentes voies physiopathologiques, il y a détersion du foyer lésionnel et réparation du tissu. Les composants cellulaires sont d'abord lysés par les protéases cellulaires, les calpaïnes principalement (protéases dépendantes du calcium), puis par les cellules mononucléées recrutées dans le foyer par des signaux venant des cellules musculaires détruites (Grounds, 1991; Tidball, 1995).

Ainsi, après induction mécanique d'une lésion musculaire chez le rat, le foyer atteint est envahi par des cellules polynucléaires neutrophiles dans les 12 premières heures, puis les macrophages affluent et éliminent les fibres nécrosées restantes dans les 2 jours suivant l'induction de la lésion. Les fibroblastes synthétisent alors du tissu interstitiel, alors que les cellules satellites, quiescentes, sont activées en myoblastes depuis la membrane basale. Au 7^{ème} jour, les myoblastes en régénération fusionnent en myotubes, pour donner un tissu cicatriciel stable à 3 semaines (Hurme *et al.*, 1991).

B. Méthodes expérimentales

Les principaux mécanismes physiopathologiques évoqués dans la partie ci-dessus peuvent être abordés expérimentalement. Certains mécanismes sont modulables pharmacologiquement, comme nous l'avons vu pour l'inflammation (inhibition des COX par les AINS, modulation de l'inflammation neurogénique par des peptides antagonistes de la substance P par exemple, utilisation du dantrolène pour diminuer la sortie du calcium sarcoplasmique vers le cytoplasme, etc...).

1. Etude de la perfusion musculaire

La perfusion sanguine peut être évaluée de plusieurs manières plus ou moins invasives. Une méthode par doppler laser peut être réalisée depuis l'extérieur du tissu, mais cette technique est au mieux semi-quantitative, et ne permet pas l'étude globale des débits sanguins de l'organe. Notamment, la profondeur d'investigation est très faible, et limite en pratique l'intérêt de la technique à l'étude des débits cutanés principalement.

La technique de mesure des débits sanguins par microsphères est invasive mais quantitative, donnant des résultats en unités de débits, permettant les comparaisons inter-études. Cette technique permet également de documenter finement les débits sanguins au sein d'un organe, notamment dans le muscle. Une revue complète consacrée à l'étude des débits sanguins par les méthodes utilisant les microsphères est disponible (Prinzen et Bassingthwaighte, 2000). La méthode consiste à administrer à l'animal par voie générale un bolus IV de microsphères marquées en radioactivité ou par fluorescence (Chien *et al.*, 1995). Les microsphères sont distribuées depuis le ventricule gauche jusque dans tout l'organisme, mais sont arrêtées par leur taille (15 μm de diamètre en général) et s'embolisent dans la circulation capillaire. Les tissus sont prélevés après euthanasie de l'animal, soumis à une digestion chimique, puis le signal radioactif ou en fluorescence est dosé (Raab *et al.*, 1999; Thein *et al.*, 2000). Au moment de l'injection des microsphères dans le ventricule cardiaque, un prélèvement de sang artériel est réalisé à débit constant et connu pendant une à deux minutes avec une pompe péristaltique depuis une artère périphérique. Le dosage du signal radioactif ou fluorescence permet d'établir une référence de débit. Ainsi, la comparaison du débit du prélèvement artériel et du signal obtenu dans le prélèvement de sang artériel et dans le prélèvement de tissu permet le calcul du débit sanguin dans le tissu (Glenny *et al.*, 1993; Thein *et al.*, 2002). L'usage de différents marqueurs fluorescents ou radioactifs à différents temps permet l'obtention de plusieurs débits chez le même animal (voir figure 8) Ainsi, jusqu'à 13 administrations de microsphères peuvent être réalisées successivement (Schimmel *et al.*, 2001). Cette technique a notamment été utilisée pour documenter l'hétérogénéité des débits sanguins dans le muscle du lapin au repos et à l'exercice (Iversen et Nicolaysen, 1989; Iversen *et al.*, 1989).

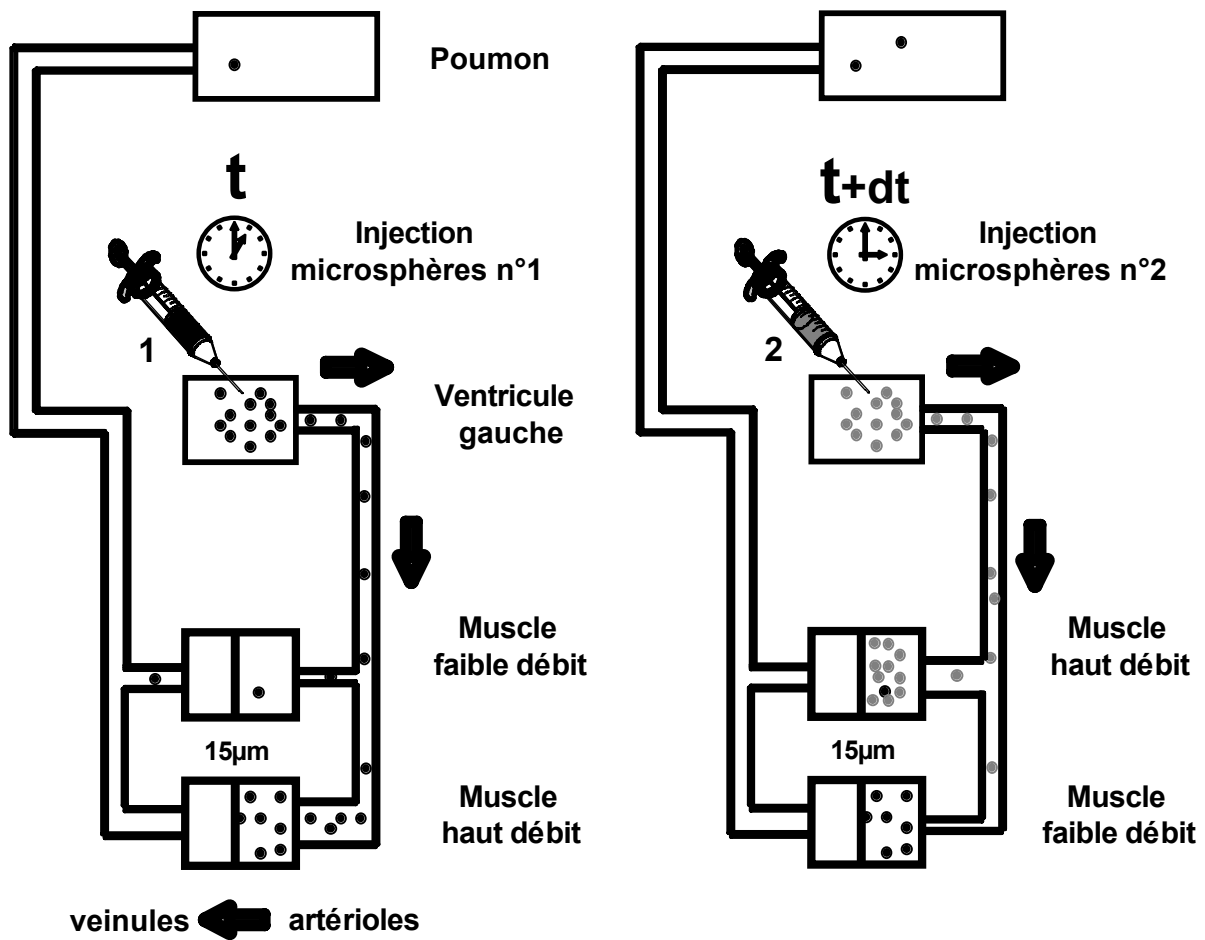


Figure 8 – Représentation schématique de la technique de mesure des débits sanguins par l'injection de microsphères dans la circulation générale

2. Génomique fonctionnelle

a) Généralités

L'ADN, ou acide désoxyribonucléique, est la base de l'information génétique contenue de manière identique dans le noyau de toutes les cellules de l'organisme. L'ADN est une macro-molécule formée de la succession aléatoire d'un très grand nombre de 4 molécules élémentaires (ribonucléotides), les bases de l'ADN : Adénine (A), complémentaire de la Thymine (T), et Cytosine (C) complémentaire de la Guanine (G). La succession de 3 bases de l'ADN forme le code génétique, c'est-à-dire la correspondance avec un acide aminé spécifique. L'enchaînement des acides aminés forme les protéines, soit les molécules « effectrices » de la cellule. C'est seulement une partie des enchaînements de l'ADN, variable selon les espèces, qui est utilisée pour former des protéines. Ces parties sont appelées les gènes, le reste est constitué d'ADN « non-codant ».

Depuis l'ADN jusqu'aux protéines, il y a plusieurs étapes qui se déroulent à l'intérieur de chaque cellule :

- La transcription : transformation de parties de l'ADN génomique en plusieurs copies d'ARN (acide ribonucléique), qui est formé des 4 bases élémentaires Adénine (A), complémentaire de l'Uracile (U), et Cytosine (C) complémentaire de la Guanine (G). L'ARN subit un processus de maturation et donne l'ARN messager (ARNm) qui ne contient que les séquences codantes.
- La traduction : synthèse des protéines à partir de l'ARNm exporté dans le cytosol

Le génome correspond à l'ensemble des gènes d'un individu, et la génomique est l'étude de la structure ou « anatomie » du génome. La connaissance de l'enchaînement des bases de l'ADN a été permise par les avancées technologiques et le séquençage systématique des génomes. Ainsi, de nombreux organismes sont aujourd'hui partiellement ou entièrement « séquencés ».

La connaissance des génomes ne permet pas d'appréhender le fonctionnement des gènes. La génomique fonctionnelle est l'étude de la « physiologie » du génome,

c'est-à-dire l'étude de l'expression ou de la fonction des gènes dans chaque cellule ou ensemble de cellules (phénotype). Ainsi, la génomique est l'étude des populations totales d'ARNm (transcriptome) ou des protéines (protéome).

Alors que le génome est fixé dans toutes les cellules de l'organisme, la constitution du transcriptome et du protéome est spécifique de chaque tissu et varie en fonction du temps et des conditions physiologiques ou pathologiques.

b) Méthodes d'étude du transcriptome

Le transcriptome est l'étude de l'expression des gènes (Voir figure 9)

- L'étude des transcrits ou des protéines pour des gènes ciblés, particuliers, peut être faite de manière individuelle par les techniques de biologie moléculaire classique. Cela consiste à quantifier l'intensité de l'expression en ARNm ou protéines dans les tissus d'intérêt. Des organismes où un gène a été soit supprimé du génome (mutants délétés ou « knock-out ») soit inactivé sélectivement dans plusieurs cellules par la méthodologie des ARN interférents (ARNi) permettent d'aborder expérimentalement les fonctions physiologiques des gènes.

- Les méthodes à haut-débit permettent une approche globale, avec l'étude concomitante d'un grand nombre de gènes, leur organisation et leurs régulations. Elles permettent d'établir des profils d'expression de gènes, en déterminant dans un tissu particulier le niveau d'expression de tous les transcrits (transcriptome). La comparaison de profils d'expression entre deux conditions d'intérêt se fait de manière simplifiée par le calcul du ratio des niveaux d'expression dans les 2 conditions pour chaque gène. Entre tissu sain et tissu pathologique, par exemple, les ratios différents de 1 permettent de détecter des gènes différentiellement exprimés, potentiellement des marqueurs de diagnostic et pronostic, ou des cibles thérapeutiques éventuelles. Ainsi, dans le cancer du sein par exemple, l'établissement de profils d'expression à partir de biopsies de tumeurs a permis de caractériser des classes de tumeurs histologiquement comparables mais pour lesquelles les réponses thérapeutiques et le pronostic sont différents (Bertucci *et al.*, 2002).

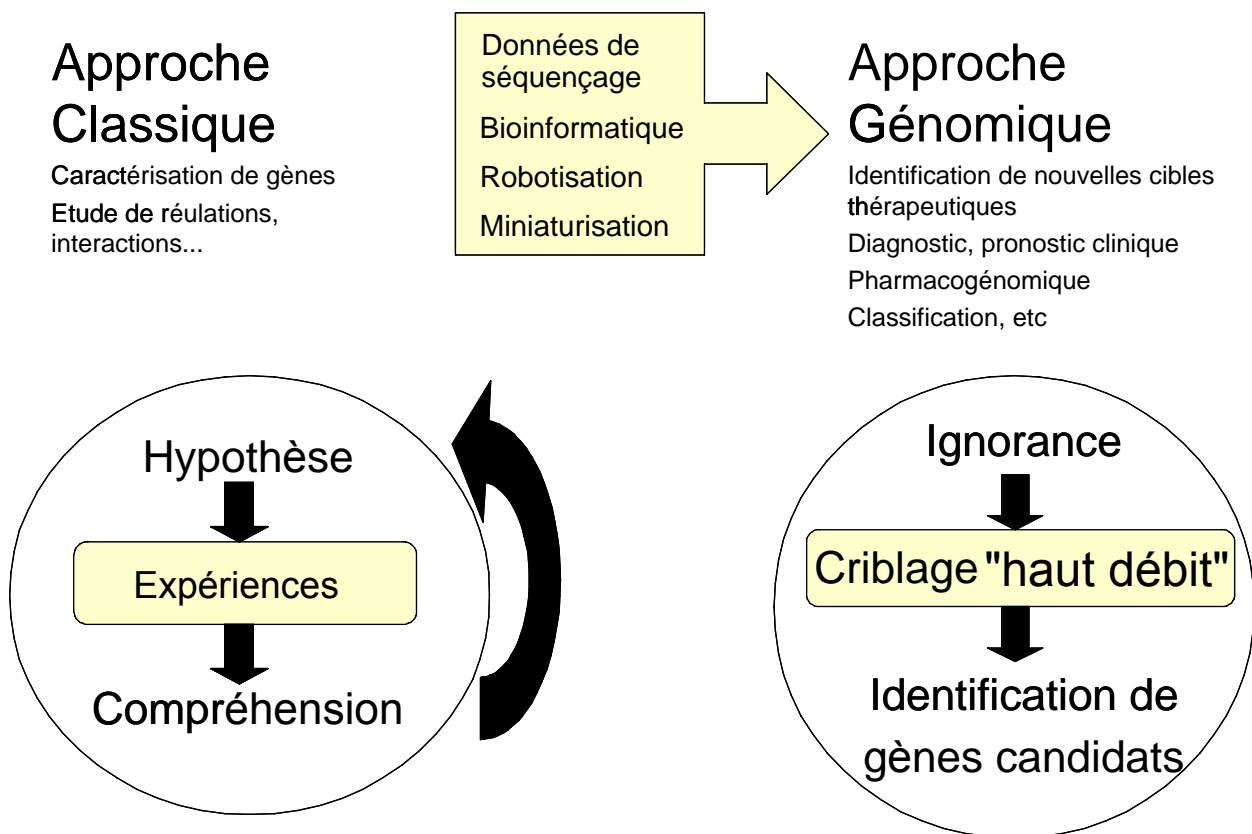


Figure 9 – Comparaison des méthodes d'étude du transcriptome : Approche classique et approche de type génomique, à haut débit.

Techniquement, il s'agit d'utiliser les méthodes d'hybridation moléculaire sur des réseaux organisés où sont déposés sur de petites surfaces un grand nombre de séquences d'ADN. Les séquences sont des oligonucléotides synthétisés ou sont issues de banques d'ADNc constituées par un seul ou plusieurs tissus d'un organisme (banques « multi-tissus »). Ce sont les « sondes », séquences connues qui correspondent en principe à des gènes, de fonction connue ou inconnue. Les échantillons à évaluer sont les « cibles », qui sont des ADNc préparés par transcription réverse à partir des ARNm extraits sélectivement du tissu étudié. Les cibles sont marquées, le plus souvent en fluorescence ou en radioactivité ($\alpha^{33}\text{P}$) au moment de la transcription réverse d'ARN en ADNc. Les ADNc s'hybrident à leur séquence complémentaire sur le réseau, de manière proportionnelle à leur nombre dans l'échantillon. Le marquage est révélé et son intensité pour chaque sonde est quantifiée sur le réseau par analyse d'images.

c) Transcriptome du muscle strié squelettique

Même si le transcriptome du muscle strié squelettique n'est pas intensivement analysé par rapport à d'autres tissus, nous décrivons ci-dessous brièvement quelques études publiées dans plusieurs domaines.

(1) Phénotype musculaire

Les profils d'expression de deux muscles à métabolisme différent ont été comparés par la technique des microréseaux chez la souris. Au total, une expression différentielle a été mise en évidence pour 49 gènes entre un muscle de type « blanc » glycolytique, le *Quadriceps*, et un muscle « rouge » au métabolisme oxydatif, le *Soleus* (Campbell *et al.*, 2001). Récemment, le transcriptome musculaire a été analysé pour 5 souches de souris différentes, soit les souches CBA, BALB, BL6, DBA, et BL10 (Turk *et al.*, 2004). Des différences ont été mises en évidence entre les 5 types génétiques pour 88 des 6144 gènes analysés (soit 1,4 %), montrant qu'il peut être difficile de comparer des souris malades et saines issues de souches différentes. Cependant, même si le nombre de gènes observés par les auteurs est grand, ils n'ont utilisé que 2 individus par type génétique pour réaliser les comparaisons (Turk *et al.*, 2004).

Chez le porc, un microréseau à ADN a été développé avec 5500 clones issus de deux banques d'ADNc constituées par 2000 clones provenant de muscles

Longissimus dorsi de fœtus porcin de 50 jours et 3500 clones provenant de muscles *Gastrocnemius* de porc nouveau-né âgé de 3 jours (Bai *et al.*, 2003). Chaque clone a été déposé en double sur le réseau. Pour expérimenter le microréseau construit, le transcriptome de deux muscles de phénotypes énergétique et contractile différents a été évalué : un muscle de type « blanc » (*Longissimus dorsi*) et un muscle de type « rouge » (*Psoas*). Des gènes à expression différentielle attendue ont permis de valider la construction du microréseau, et une série de nouveaux gènes candidats entre les 2 types de muscle a été mise en évidence. Un ratio d'expression différentielle entre le *Psoas* et le *Longissimus* de niveau au moins égal à 2 a été considéré comme significatif, regroupant 70 séquences du microréseau, principalement des gènes d'origine mitochondriale (Bai *et al.*, 2003).

(2) Qualité de la viande

Un travail mené par l'INRA de Theix a utilisé le transcriptome musculaire pour tenter de mettre en évidence des gènes ou des profils d'expression de gènes associés à la qualité de la viande ou au potentiel de croissance musculaire (Sudre, 2003). Des cibles issues de deux muscles bovins (*Rectus abdominalis* et *Semitendinosus*) à des stades de développement variés (110, 180, 210 et 260 jours de vie fœtale, puis 15 mois après la naissance) ont été hybridées avec des sondes hétérologues de muscle humain fixées sous forme de 1339 produits PCR sur des membranes de nylon (Sudre *et al.*, 2003). Cette étude a montré des différences d'expression pour 110 gènes au cours de la myogenèse chez le bovin, certains ayant déjà été mis en évidence par des approches classiques, d'autres étant nouvellement décrits. L'analyse du transcriptome a aussi permis de comparer les profils d'expression de muscles de taurillons charolais issus de lignées divergentes sélectionnées sur leur potentiel de croissance musculaire. Les animaux phénotypiquement les plus extrêmes ont été testés, ce qui a montré que le fort développement musculaire est associé à un métabolisme plus glycolytique.

(3) Pathologies musculaires

La technique des microréseaux à ADN a été utilisée dans la recherche de gènes candidats impliqués dans la phase précoce de développement des lésions musculaires chez la souris (Summan *et al.*, 2003). Ainsi, des ADNc issus de muscle tibial antérieur 24 h après induction d'une lésion par congélation ponctuelle du tissu

ont été comparés par hybridation sur des réseaux à des ADNc extraits de muscles contrôles. Histologiquement, le muscle était oedémateux, et 60 % des cellules étaient lésées, avec un influx localisé de cellules inflammatoires. Parmi les 732 séquences oligonucléotidiques présentes sur les réseaux et représentant des gènes sélectionnés et impliqués dans les phénomènes inflammatoires, la prolifération et la différenciation cellulaires ou la nécrose et l'apoptose, 6 % présentaient une expression différentielle, soit une variation d'expression d'au moins 1.7 fois par rapport au muscle contrôle. 3.2 % correspondaient à des séquences en régulation négative, majoritairement des gènes impliqués dans le métabolisme (protéines de transport ionique dans la mitochondrie, métabolisme intermédiaire) et la signalisation cellulaire. 2.8 % correspondaient à des gènes en régulation positive, principalement des gènes associés aux processus de l'inflammation, des enzymes de résistance au stress oxydatif ou de la prolifération cellulaire. Les variations observées dans le muscle 24 h après induction de la lésion permettent à la cellule de conserver son homéostasie et de mieux résister aux radicaux libres. Les chimiokines comme la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), le M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et son récepteur, semblent jouer un rôle dans les phénomènes lésionnels du muscle strié squelettique et sont des gènes candidats dont l'activité physiologique précise est à découvrir pour de nouvelles approches thérapeutiques des lésions musculaires (Summan *et al.*, 2003).

Deuxième partie :

ETUDE EXPERIMENTALE

Objectifs

Les objectifs de notre travail étaient :

1. Evaluer et quantifier les lésions musculaires iatrogènes en utilisant un modèle expérimental. Plusieurs approches non invasives d'évaluation des lésions musculaires ont été testées chez l'ovin: Il s'agissait principalement d'une méthode basée sur l'analyse pharmacocinétique de la créatine kinase plasmatique, de l'échographie musculaire et de la mesure de la température du site d'injection. Les conséquences pharmacocinétiques entraînées par le développement des lésions sur le processus d'absorption ont été ensuite évaluées.
2. Appréhender les mécanismes physiopathologiques du développement des lésions musculaires. Trois principales voies ont été explorées : La composante hémodynamique, la composante inflammatoire et une approche élargie par criblage génomique. Ainsi, les variations hémodynamiques locales ont été suivies dans une lésion iatrogène en développement chez le lapin, l'expression des cyclooxygénases a été étudiée dans un modèle d'ischémie-reperfusion musculaire chez le rat, et enfin le transcriptome musculaire a été exploré à différents stades d'évolution d'une lésion iatrogène chez le porc.

I. Détection et évaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes

Une grande partie des travaux expérimentaux évoqués dans cette partie est décrite dans les articles 1 et 2.

A. Etude 1 - Validation des méthodes de quantification des lésions (Article 1)

Problématique : La méthode d'évaluation des lésions la plus utilisée repose sur l'euthanasie des animaux et l'examen anatomopathologique des lésions. Or, des méthodes alternatives non invasives pouvaient être proposées : L'analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique et l'examen échographique du muscle ont été décrits antérieurement mais n'ont pas été validés par rapport à la méthode de référence, c'est-à-dire soit la mesure directe de la masse des lésions musculaires. Une mesure de la température cutanée en regard du site injecté a été également réalisée comme marqueur de l'inflammation locale.

Objectifs : Valider les méthodes de détection et de quantification des lésions musculaires par analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique, par échographie, et par la température cutanée du site d'injection.

Matériels et méthodes : Des lésions musculaires iatrogènes ont été induites dans les muscles *Longissimus dorsi* gauche et droit chez 5 brebis par administration IM d'une formulation irritante d'oxytétracycline à effet « longue action » (OTC-LA). Chaque animal a reçu à 22 jours d'intervalle deux administrations IM d'un même volume d'OTC-LA de façon à obtenir des lésions anciennes et récentes (voir article 1).

Examen macroscopique des sites d'injection : Après excision des muscles *Longissimus dorsi*, des tranches d'environ 1 cm d'épaisseur ont été découpées. Ces tranches ont été réparties aléatoirement et toutes les lésions ont été évaluées par trois opérateurs en aveugle et à deux reprises : les lésions ont été d'abord classées qualitativement en quatre grandes catégories suivant la lésion dominante (absence de lésion, hémorragie, nécrose et fibrose), puis mesurées directement à l'aide d'une règle graduée (longueur L_i et hauteur H_i maximales). La surface des lésions par tranche ($S_{i,macro}$) a été obtenue par $S_i = L_i \times H_i$ et a permis d'évaluer le volume des lésions par site d'injection (V_{macro}) en tenant compte de l'épaisseur (E_i) des tranches :

$$V_{\text{macro}} = \sum_i \left(\frac{(S_{i, \text{macro}} + S_{i+1, \text{macro}})}{2} \times E_i \right) \quad \text{Équation 1}$$

Ce volume rapporté à la densité d du muscle a permis le calcul de la masse de muscle atteint, Md_{macro} :

$$Md_{\text{macro}} = \frac{V_{\text{macro}}}{d} \quad \text{Équation 2}$$

Après la série d'examens macroscopiques visuels, la surface des lésions ($S_{i, \text{anal}}$) a été mesurée pour chaque tranche par planimétrie assistée par ordinateur. Ce processus a permis de circonscrire les lésions avec plus de précision par le grossissement des images à l'écran. L'épaisseur des tranches a été mesurée de la même façon. Le volume total de chaque lésion a été reconstruit sur l'ensemble des tranches. Cette méthode de quantification a été choisie comme référence pour les méthodes non invasives testées, par recherche de corrélation et de concordance.

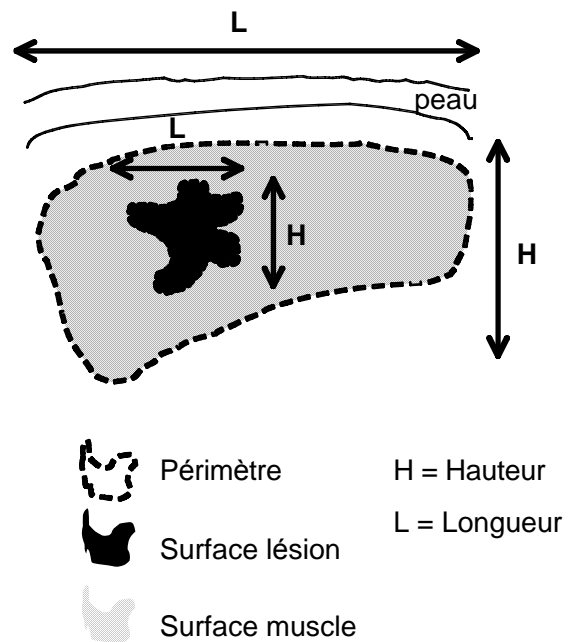
Echographie : Chez les mêmes animaux, plusieurs séries d'examens échographiques standardisés et répétés, en coupe transversale, ont été réalisés aléatoirement et en aveugle par 3 opérateurs sur les muscles *Longissimus dorsi* en l'absence de toute administration. Un appareil portatif et une sonde linéaire de fréquence 7,5 MHz ont été utilisés. Ces examens ont permis d'évaluer les qualités métrologiques intrinsèques de l'échographie en utilisant des repères anatomiques.

Le même type d'examen a ensuite été réalisé sur les muscles ayant reçu les administrations de la formulation irritante d'OTC-LA. Un suivi du site injecté par échographie a été mené à intervalles réguliers par un même opérateur dans les jours suivant chaque administration intramusculaire (Voir figure 10)

De plus, juste avant euthanasie, une série d'examens échographiques a été réalisée par les 3 opérateurs de la même façon que sur le muscle intact afin de connaître l'aptitude de l'échographie à détecter les lésions musculaires et d'évaluer ses qualités métrologiques lors de la mesure d'une lésion. Les résultats des examens échographiques ont été comparés aux résultats de l'examen macroscopique *post-mortem* réalisé par analyse d'images.



Echographie



Représentation schématique

Figure 10 – Echographie (gauche) du muscle *Longissimus dorsi* en coupe transversale chez une brebis présentant une lésion iatrogène induite par l'administration IM d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. Représentation schématique (droite) du cliché échographique et dimensions mesurées

Mesure de la température cutanée : La température cutanée a été mesurée de manière répétée au-dessus du site d'administration et au-dessus du muscle témoin controlatéral à l'aide d'un thermomètre à infrarouges et visée lumineuse.

Analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique :

La méthode utilisée pour la quantification des lésions par analyse pharmacocinétique non-compartmentale est décrite dans la synthèse bibliographique et dans l'article 1. Brièvement, une solution de CK homologue a été administrée par voie IV et IM aux animaux de l'étude pour déterminer respectivement la clairance et la biodisponibilité de la CK depuis le muscle. Plusieurs prélèvements sanguins ont été réalisés après chacune des deux administrations d'OTC-LA avec dosages sériés de la concentration d'activité CK plasmatique.

Une approche complémentaire par modélisation compartmentale et déconvolution a été également menée et est décrite ici :

Les activités plasmatiques observées après administration IV de la solution de CK ont été ajustées par une méthode de régression non linéaire, pour tous les animaux, à l'aide d'une équation bi-exponentielle du type :

$$Y(t) = Y_1 \bullet \exp(-\lambda_1 t) + Y_2 \bullet \exp(-\lambda_2 t) \quad \textbf{Équation 3}$$

Avec $Y(t)$, l'activité plasmatique (U/L) de CK au temps t , Y_1 et Y_2 (U/L) les coefficients pré-exponentiels, λ_1 et λ_2 (/min) les exposants des termes exponentiels (le nombre de termes a été choisi sur la base de l'optimisation du critère d'Akaike).

Cette équation bi-exponentielle peut être interprétée par un modèle bicompartmental avec une cinétique d'élimination d'ordre un à partir du compartiment central. Le volume de distribution à l'état d'équilibre (V_{ss}) a été alors déterminé pour permettre le calcul, par déconvolution discrète, des vitesses instantanées d'entrée de CK dans la circulation générale à partir des profils observés de concentration d'activité CK dans le compartiment plasmatique (central) après l'administration IM de l'OTC-LA.

L'équation de convolution suivante a été résolue en utilisant un logiciel de pharmacocinétique « SimFit » développé par l'UMR 181 de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA-ENVT :

$$C(t) = \int_0^t F(t - \tau).S(\tau).d\tau \quad \textbf{Équation 4}$$

$C(t)$ est la concentration d'activité CK, connue, mesurée au temps t après administration d'OTC-LA par voie intramusculaire, $S(\tau)$, à calculer, est le débit d'entrée continu de CK dans le compartiment plasmatique, $F(t)$ est la réponse CK observée suite à une impulsion d'entrée unique de CK, connue d'après le profil des activités observées après l'administration IV de CK en bolus unique.

Les vitesses d'entrée de CK dans le compartiment central donnent une information sur l'évolution temporelle de la libération de CK par le muscle. Cette approche a permis également de calculer les quantités de CK présentes dans chaque compartiment à un instant donné, la quantité totale de CK parvenant dans le compartiment central, et la quantité de CK restant à absorber à chaque instant. Connaissant la concentration moyenne d'activité CK du muscle de brebis, la quantité totale de CK accédant au plasma a été exprimée en quantité équivalente de muscle lésé.

Résultats :

Examen macroscopique des sites d'injection : Qualitativement, des lésions de stade avancé et des lésions plus récentes ont été observées, correspondant à la première et à la seconde série d'injections respectivement. Parmi l'ensemble, 77 % des lésions de fibrose ont été observées parmi les sites d'administration de la première série d'injections (c'est-à-dire les lésions les plus anciennes), 97 % des lésions hémorragiques et 55 % des lésions de nécrose ont été observées parmi les sites d'administration de la seconde série d'injections (c'est-à-dire les lésions les plus récentes).

Au cours des 2 séries d'examen qualitatif des sites d'injection par les 3 investigateurs, les résultats donnés étaient en agrément total pour 53 % des tranches analysées (les tranches ont toujours été classées de la même façon). L'agrément était d'au moins 50 % pour 70 % des tranches (les tranches ont été classées dans une même catégorie pour au moins 50 % des observations). Entre les 2 observations de chacun des 3 investigateurs, les classements étaient en agrément total pour 58 % des tranches examinées, et sans agrément pour 21 % des tranches (aucune des 2 observations successives par les 3 investigateurs n'a donné le même résultat de classement).

Pour les mesures directes des surfaces des lésions par les 3 investigateurs, les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité ont été de 48 % et de 34

% respectivement. Le coefficient de détermination avec la mesure par analyse d'images est $R^2=0.72$ (figure 11). Le tableau 5 résume les principaux résultats obtenus par mesure directe et par analyse d'images.

Echographie : Les coefficients de variation de répétabilité (ou intra-opérateur) et de reproductibilité (ou inter-opérateurs) ont été déterminés pour 4 paramètres mesurés du muscle *longissimus dorsi* sain, et pour les lésions de ce même muscle avant abattage. Les principaux résultats de validation figurent dans le tableau 6.

Après abattage, des lésions visibles macroscopiquement sont présentes chez tous les animaux. *A contrario*, malgré un repérage précis de la position de la sonde, des lésions sont détectées sur 32 % des clichés obtenus par le premier opérateur, 48 % pour le second, et 100 % pour le dernier.

L'observation de la figure 12 indique que les dimensions des lésions sont sous-estimées de 2.5 à 5.3 fois en moyenne par échographie par comparaison avec la méthode d'analyse d'images des lésions macroscopiques.

Les échographies quotidiennes ont été très difficiles à analyser : des zones musculaires anormales ont été détectées surtout dans les heures suivant les administrations IM. La majorité des valeurs moyennes mesurées pour chaque temps après injection sur l'ensemble des brebis n'est pas significativement différente de 0 ($p<0.05$). Voir figure 13.

Mesure de la température cutanée : Après chaque administration IM, un profil biphasique a été observé pour les températures cutanées mesurées chez tous les animaux, avec une phase d'hypothermie précoce et fugace (2 heures après administration), suivie d'une phase d'hyperthermie durant environ 3 à 4 jours. Le tableau 7 regroupe les paramètres descriptifs des températures cutanées. Des différences significatives ont été observées entre la température du site administré et celle du site témoin controlatéral pour les temps 3 et 30 min, puis 12, 24, 48 et 72 h ($p<0.05$).

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les profils de température individuels et le volume des lésions musculaires.

Tableau 5 – Masse de lésion musculaire mesurée macroscopiquement suite à deux injections d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. Pour chaque site d'injection, la mesure macroscopique a été réalisée directement à l'aide d'une règle graduée, ou par analyse d'images. Les mesures directes représentent la moyenne des mesures effectuées par trois opérateurs

Brebis	Masse de muscle détruit (g)			
	lésions anciennes (28 jours)		lésions récentes (7 jours)	
	mesure directe	analyse d'images	mesure directe	analyse d'images
A	2.36	4.17	7.51	13.79
B	1.61	1.80	3.45	10.71
C	4.71	5.69	10.14	13.79
D	4.26	5.60	11.16	17.67
E	7.25	6.65	4.17	4.38
Moyenne ± SD	4.04 ± 2.21	4.78 ± 1.89	7.29 ± 3.45	12.07 ± 4.96

Tableau 6 – Coefficients de variation de répétabilité (intra-opérateur) et reproductibilité (inter-opérateur) des mesures échographiques d'un muscle témoin intact et d'une lésion musculaire induite par une injection d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis.

Mesure	Muscle Longissimus dorsi intact		Lésions du muscle	
	Répétabilité	Reproductibilité	Répétabilité	Reproductibilité
	(%)	(%)	(%)	(%)
Hauteur	6.1	1.6	51.4	92.0
Longueur	5.6	6.6	66.7	70.0
Surface	9.5	4.1	61.4	101.4
Périmètre	5.0	2.6	60.9	81.9

Tableau 7 – Paramètres descriptifs de la température cutanée mesurée régulièrement après une injection d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis.

Paramètre	Brebis					Moyenne \pm SD
	A	B	C	D	E	
D _{min} (°C)	-4.1	-3.02	-3.88	-4.08	-4.76	-3.9 \pm 0.62
D _{max} (°C)	3.26	1.32	4.94	2.4	3.56	3.1 \pm 1.35
T _{min} (min)	3	30	3	3	3	8.4 \pm 12.07
T _{max} (h)	48	24	48	48	120	57 \pm 36

D_{min} est la plus grande différence négative de température. D_{max} la plus grande différence positive. T_{min} et T_{max} sont respectivement leurs moments d'observation après injection. Les temps de mesure ont été de -35, -20, 3 et 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 h, puis 1, 2, 3, 3, 4, 5 et 6 jours.

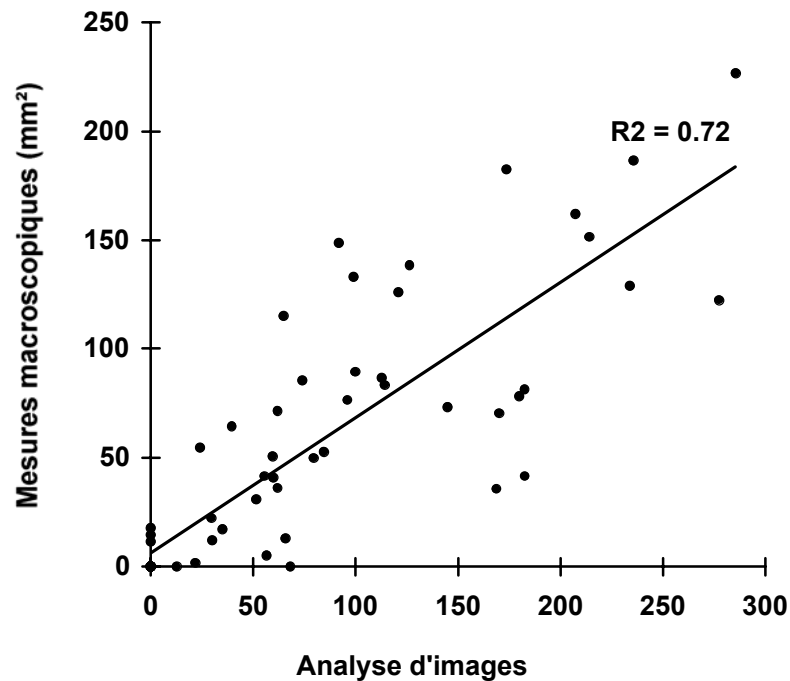


Figure 11 – Mesure des lésions musculaires induites par l’injection d’environ 5 mL d’une formulation longue action d’oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. Relation entre la mesure des surfaces lésionnelles par la méthode macroscopique directe et par l’analyse d’images

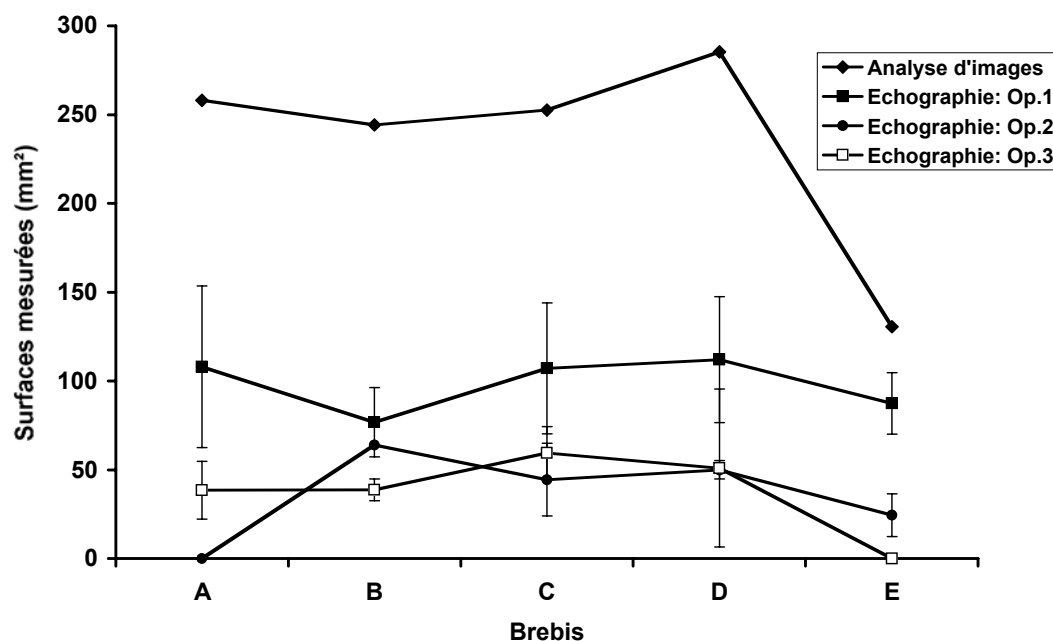


Figure 12 – Surfaces maximales des lésions musculaires induites par l’injection d’environ 5 mL d’une formulation longue action d’oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis mesurées par analyse d’images et par 3 opérateurs différents par échographie chez 5 brebis

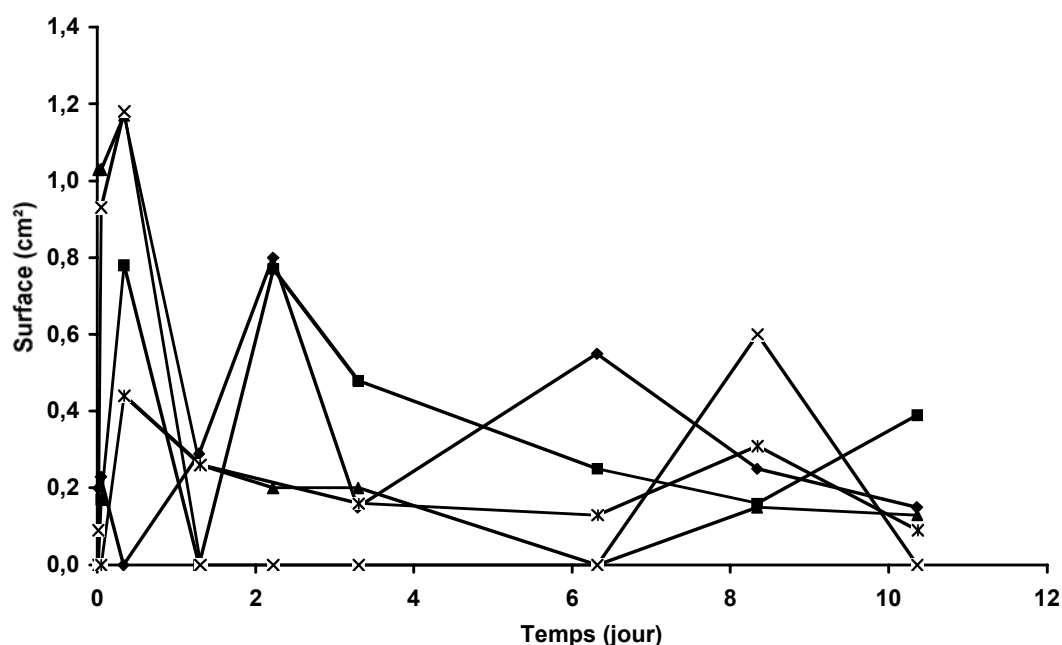


Figure 13 – Suivi des surfaces par échographie des lésions musculaires induites par l’injection d’environ 5 mL d’une formulation longue action d’oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis

Analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique : Les profils pharmacocinétiques des concentrations d'activité CK plasmatique après administrations IV et IM de CK homologue exogène, et après administration IM d'OTC-LA sont présentés sur la figure 14.

Par l'analyse non-compartimentale, la masse calculée de l'équivalent musculaire détruit lors d'une seule administration d'OTC-LA est de 11.7 ± 4.61 g (voir tableau 8). Un effet de l'individu a été mis en évidence, mais il n'y a pas de différence significative entre les deux administrations IM successives d'OTC-LA pour un même animal.

Par l'analyse compartimentale et la déconvolution, la masse calculée de l'équivalent musculaire atteint lors d'une seule administration d'OTC-LA est de 10.9 ± 4.57 g. (voir tableau 9). Il n'y a pas de différence significative entre les deux administrations IM successives d'OTC-LA pour un même animal.

Les profils de débit massique d'entrée de CK dans le compartiment plasmatique à partir du muscle sont comparables pour l'ensemble des brebis. Trois principaux pics de débit de CK ont été observés: précoce à 0.8 ± 0.45 h (visible pour les 10 cinétiques), à 5.5 ± 1.30 h (pour 8/10 cinétiques) puis à 16.4 ± 1.87 h (pour 9/10 cinétiques) (voir figure 15).

La moitié de la quantité totale de CK qui est libérée par le muscle gagne le plasma dans les 15-18 premières heures après l'administration IM.

La figure 16 montre l'agrément ($R^2 = 0.68$ ou $R^2 = 0.72$) entre la quantification des lésions par l'analyse pharmacocinétique de la CK plasmatique (analyse non compartimentale, ou analyse compartimentale et déconvolution) et celle par la reconstitution des lésions par analyse d'images.

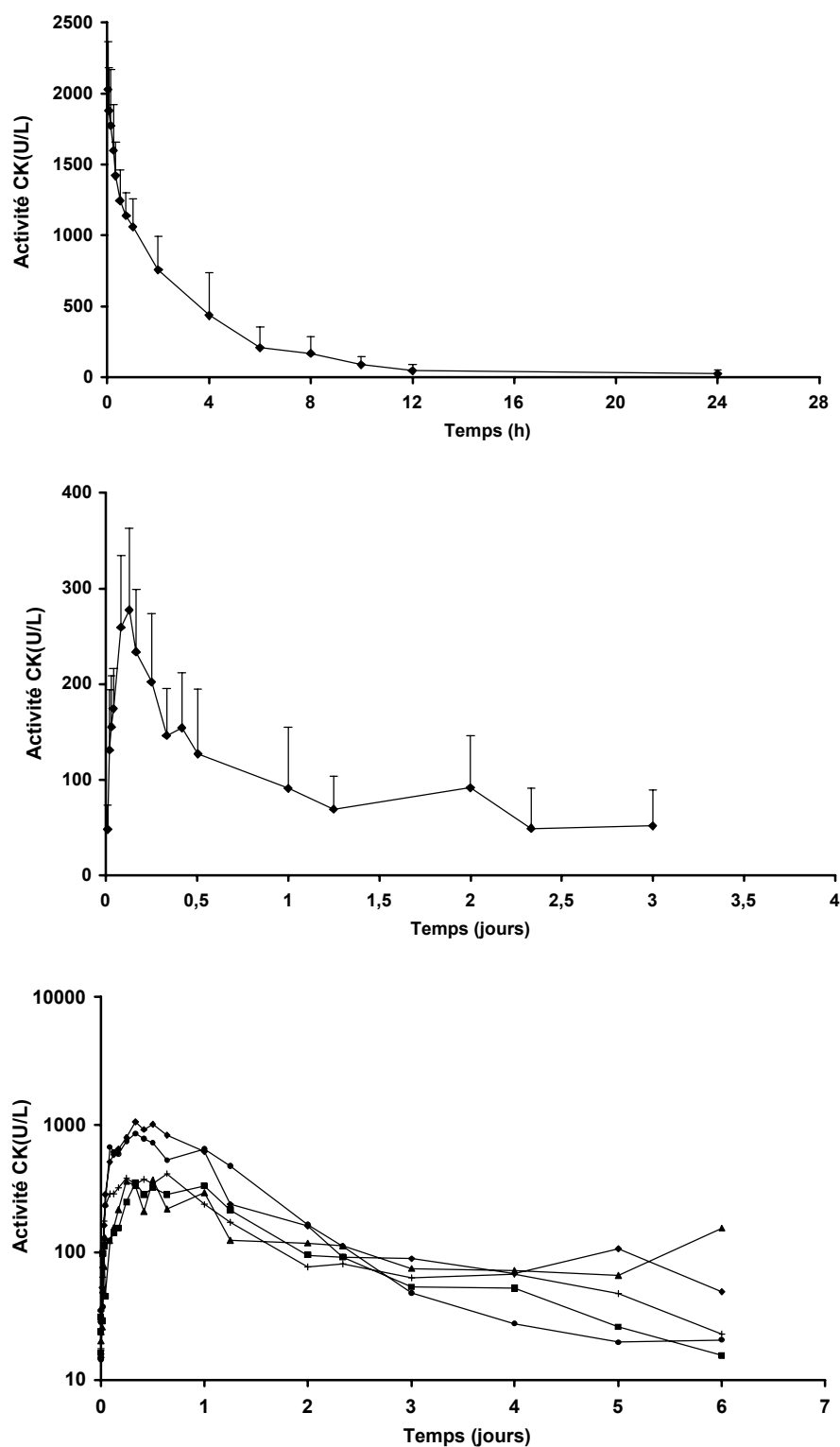


Figure 14 – Concentration d'activité plasmatique CK en fonction du temps chez 5 brebis. Haut : administration IV d'homogénat musculaire à 100 U CK/kg (moyenne +/- sd) ; Centre : administration IM d'homogénat musculaire à 150 U CK/kg (moyenne +/- sd) ; Bas : Administration IM de 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg)

Tableau 8 - Analyse non-compartimentale de la concentration d'activité CK libérée suite à une injection d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. La masse de lésion musculaire a été calculée par analyse pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique.

Brebis	1^{ère} injection IM		2^{ème} injection IM	
	AUC_{CK(IM,OTC-LA)} (U.min/mL)	Masse (g)	AUC_{CK(IM,OTC-LA)} (U.min/mL)	Masse (g)
A	1583	20.2	1146	15.2
B	724	4.3	1732	10.2
C	909	11.0	891	11.2
D	1669	9.4	1979	12.2
E	868	8.8	520	5.2
Moyenne ± SD	1151 ± 394	11.2 ± 6.65	1254 ± 536	12.2 ± 2.17

Tableau 9 - Masse de lésion musculaire calculée par modélisation pharmacocinétique et déconvolution suite à deux injections d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis.

Brebis	Masse de muscle détruit (g)	
	1^{ère} injection IM	2^{ème} injection IM
A	18.8	14.3
B	3.4	7.5
C	9.5	11.5
D	10.5	11.7
E	7.8	4.4
Moyenne ± SD	10.6 ± 6.36	11.3 ± 2.80

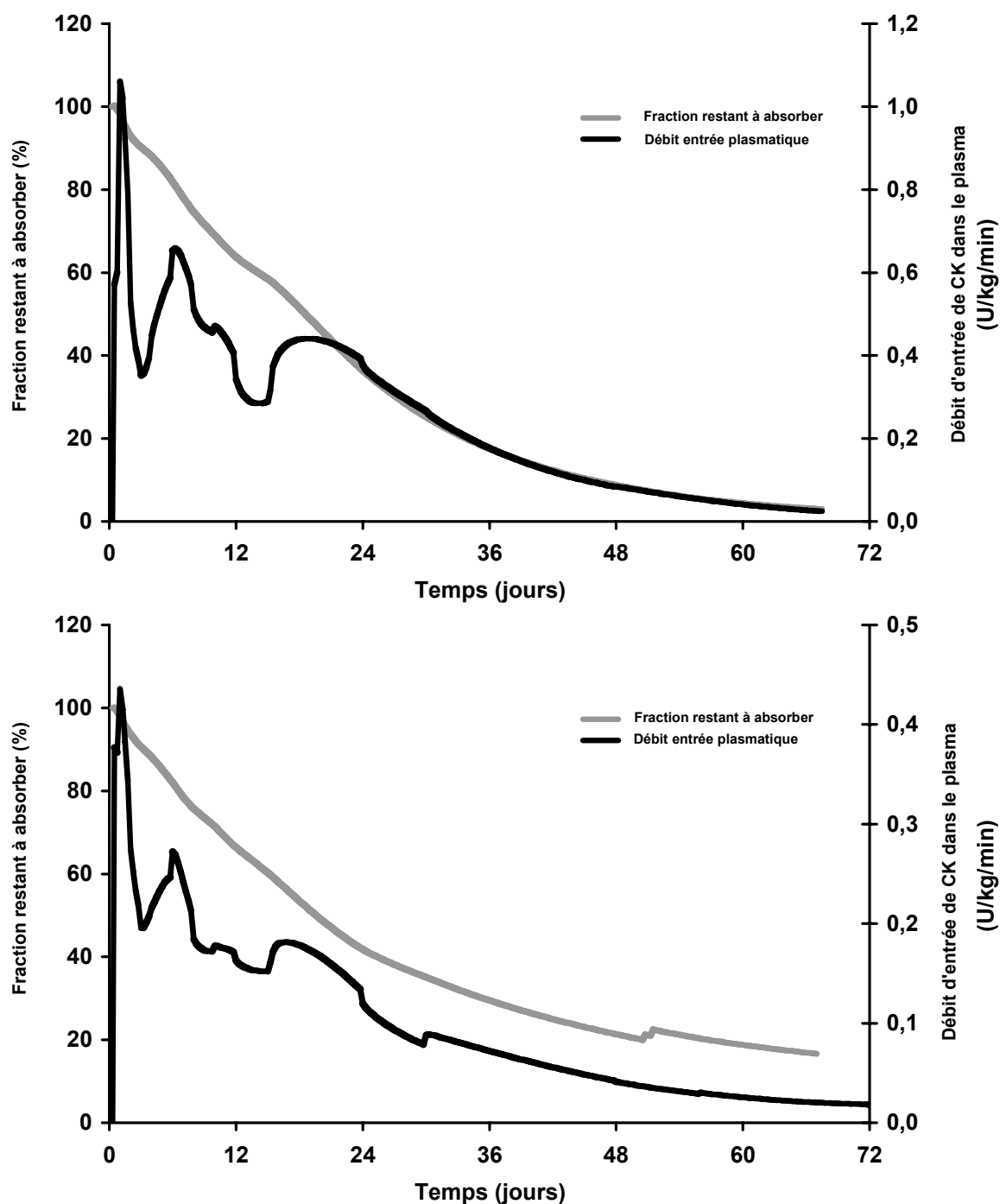


Figure 15 – Lésions induites par l'injection d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. Reconstitution par déconvolution pharmacocinétique du débit d'entrée de CK dans le compartiment plasmatique et de la fraction instantanée de la quantité de CK restant à absorber du muscle vers le plasma. Haut : Profil individuel chez un animal ; Bas : Profil moyen sur 10 administrations IM

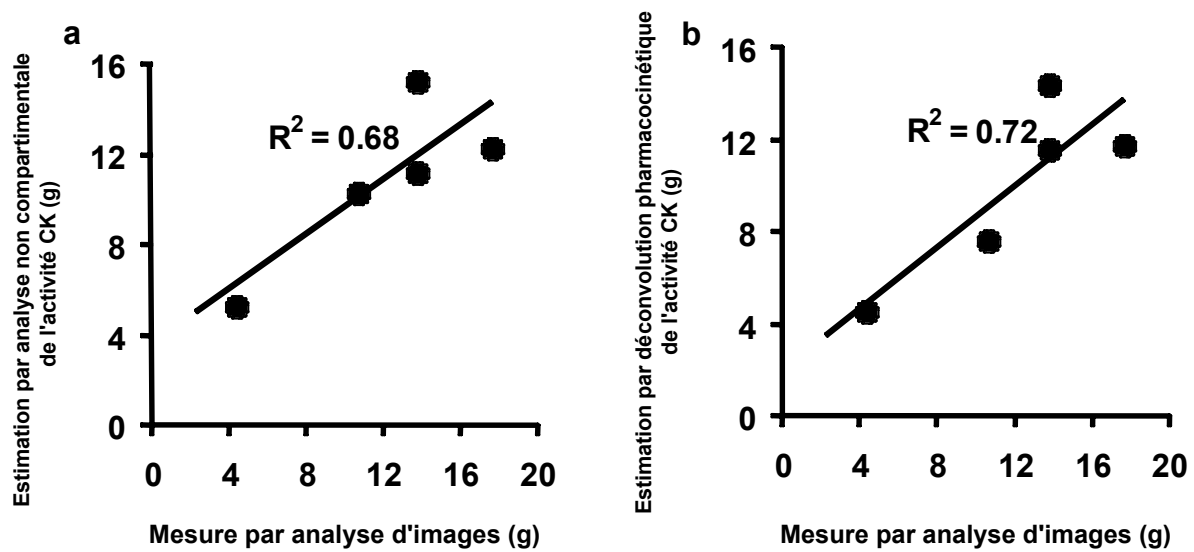


Figure 16 – Mesure des lésions musculaires induites par l'injection d'environ 5 mL d'une formulation longue action d'oxytétracycline (20 mg/kg) chez 5 brebis. Relation entre l'estimation du volume d'une lésion récente par l'approche pharmacocinétique et par l'analyse d'images.

- a) Analyse non compartimentale de la concentration d'activité CK plasmatique
- b) Analyse par déconvolution pharmacocinétique de la concentration d'activité CK plasmatique

Article 1 :

Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep.

Ferre PJ, Concordet D, Laroute V, Chanoit GP, Ferre JP, Manesse M, Lefebvre HP.

American Journal of Veterinary Research, 2001 Nov;62(11):1698-705.

Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep

Pierre J. Ferré, DVM, MS; Didier Concordet, PhD; Valérie Laroute, PhD; Guillaume P. Chanoit, DVM; Jean-Pierre Ferré, PhD; Martial Manesse, DVM, PhD†; Hervé P. Lefebvre, DVM, PhD

Objectives—To investigate and validate noninvasive methods for the quantitative evaluation of postinjection muscle damage.

Animals—5 adult sheep.

Procedures—Muscle lesions were induced twice in the lumbar region of the longissimus dorsi muscles (2 sides) by IM administration of a 20% formulation of long-acting oxytetracycline (20 mg/kg of body weight). Clinical signs and local cutaneous temperature above the injection site were recorded. Muscle lesions were quantitatively evaluated by ultrasonography and by use of pharmacokinetic analysis of plasma creatine kinase activity, and both were compared with a comprehensive planimetric computer-assisted analysis of the injection sites after euthanasia.

Results—Transient cutaneous hypothermia (temperature change, -3.9 ± 0.62 C) and subsequent persistent hyperthermia (3.1 ± 1.35 C) were observed after the administrations. Despite coefficient of variation $< 10\%$ for precision of ultrasonographic measurement of normal muscle, measurements of the lesions, with coefficient of variation $> 60\%$ for precision, were systematically underestimated. Quantitative evaluation of muscle damage by use of pharmacokinetic analysis of creatine kinase (12.1 ± 4.96 g) was in agreement with results of macroscopic planimetric evaluation (10.8 ± 3.64 g).

Conclusions and Clinical Relevance—Ultrasonography cannot be used for quantitative assessment of postinjection muscle damage. Pharmacokinetic analysis of creatine kinase provides an accurate quantitative evaluation of macroscopic muscle damage after IM administration of drugs. (*Am J Vet Res* 2001;62:1698–1705)

The IM route is the major parenteral route of drug administration used in cattle, sheep, and pigs. Its

main drawbacks are muscle damage and the persistence of drug residues at the site of injection. In the 1990s, meat trimming, which had a severe economic impact, was shown to result directly from such blemishes. In a national survey¹, estimated total trim losses and decreased meat tenderness in cattle amounted to \$200 million/y. Drug residues at the injection site were correlated with the index of muscle irritation in pigs.² Postinjection muscle damage is also an ethical issue. Results of 1 study³ indicated that as many as 83% of pigs had hind limb paralysis after IM administration of a long-acting antimicrobial.

Various factors such as volume, concentration, and speed of injection caused postinjection muscle damage and were investigated during the 1980s.⁴ However, no simple or easy solution was found to limit development of such lesions. For this reason, evaluation of local tolerance to drugs remains a critical issue prior to the marketing of formulations. Current US⁴ and European⁵ guidelines are designed to assess post-mortem lesions by use of macroscopic examination (with or without microscopic examination) concomitantly with residue studies. This approach is expensive and requires a large number of animals to be euthanized at different time intervals after drug administration. Evaluation of local tolerance is based on scoring systems that are semiquantitative and difficult to interpret. These scoring systems are not defined in guidelines and differ among studies. Such an approach has to be performed on target species, because extrapolation is not possible; tolerance in rats is not predictive of tolerance in cattle,⁶ and tolerance in rabbits is not predictive for tolerance in dogs.⁷ This is particularly critical from the ethical point of view, especially for companion animals, in which residue studies are not required. For all these reasons, a number of alternatives such as ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase (CK) have been proposed during the last 10 years. The optimal approach for in vivo evaluation of postinjection muscle damage should be noninvasive, quantitative, predictive of economic loss, dynamic (to continuously assess development of the injury), applicable to the target species, and cost effective. Thus, there are ethical, financial, and technical reasons for developing better methods for evaluation of such damage.

The purpose of the study reported here was to test and validate noninvasive methods for quantitative evaluation of postinjection muscle damage. Sheep were chosen as the test animal model because of ease in han-

Received Nov 28, 2000.

Accepted Mar 19, 2001.

From the Unité Mixte de Recherche 181, Institut National de la Recherche Agronomique Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales (PJ Ferré, Concordet, Laroute, Chanoit, J-P Ferré, Lefebvre) et Anatomie, (Manesse), National Veterinary School, 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 03, France. Dr. Chanoit's present address is the Department of Small Animal Medicine and Surgery, National Veterinary School of Lyon, BP83, 69280 Marcy l'Etoile, France.

The authors thank Nadine Gautier, Nathalie Arpaillange, Jean-Pierre Gau, Joseph Maligoy, and Patrice Rouby for technical assistance.

A portion of this study was presented at the 8th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Jerusalem, Israël, Jul 30–Aug 3, 2000.

†Deceased.

dling, performance of ultrasonography, and sampling of the lumbar muscles. The selected test article was a long-acting formulation of oxytetracycline. Three non-invasive methods were chosen and applied at the same time: pharmacokinetic analysis of plasma CK activity, ultrasonography, and cutaneous temperature measurement above the injection site. These noninvasive methods were compared with a reference method of post-mortem quantification of muscle lesions by use of macroscopic planimetric analysis.

Materials and Methods

Sheep—Five adult ewes that weighed (mean \pm SD) 50 ± 2.1 kg were acclimated to the experimental conditions for 1 month. Ewes were housed individually in facilities at the Veterinary School of Toulouse, which were approved by the French Ministry of Agriculture and were in accordance with the guidelines for animal care and use. Ewes were fed daily with 1.2 kg of hay and 250 g of pellets.^b Fresh water was provided ad libitum. The thoracolumbar area was regularly sheared before the IM administrations and the monitoring of the IM injection sites. Clinical observations of all ewes were performed daily throughout the experimental phases.

Oxytetracycline and muscle homogenate—A 20% formulation^c of long-acting oxytetracycline was used as a test article and was administered IM at the nominal dose of 20 mg/kg of body weight (ie, a volume of 5 ml for a 50-kg sheep).

Homologous muscle homogenate was prepared in saline (0.9% NaCl) solution as described.⁸ Briefly, 1 sheep muscle (triceps brachii) was rapidly sampled after a sheep was euthanatized; the sample was minced, homogenized, and centrifuged twice at $13,500 \times g$ for 1 hour. Activity of CK was assessed in the homogenate solution immediately before administration in periods 1 and 3.

Experimental design—The same 5 ewes were used during 4 experimental periods. During period 1, pharmacokinetic variables for CK were assessed after IV administration of 3 ml of a homologous muscle homogenate at a dose of 100 U/kg on day 1. In periods 2 and 4, 2 IM administrations of oxytetracycline were performed with a washout interval of 22 days on days 14 (period 2) and 36 (period 4) to evaluate the local muscle reaction. Each IM administration of oxytetracycline was followed by repeated blood samplings, standardized repeated ultrasonographic examinations, and assessment of local cutaneous temperature above the injection site. For period 3, systemic bioavailability of CK from muscle was assessed after IM administration of 5 ml of a homologous muscle homogenate at a dose of 150 U of CK/kg on day 28. The ewes were euthanatized on day 43 (ie, 29 and 7 days after the first and second IM administrations, respectively).

Drug administration and blood sampling—Intravenous administration was performed as a bolus through a catheter in the right jugular vein, which was placed 24 hours before administration. The IM administrations were performed in the lumbar area, using 17-gauge sterilized stainless steel needles.^d Oxytetracycline was administered in the right longissimus dorsi muscle for period 2 and in the left longissimus dorsi for period 4. The needle was inserted 2 cm vertically into the midbelly of the lumbar region of the muscle, equidistance from the dorsal spinous process of the adjacent vertebra and the extremity of the transverse vertebral process. In period 3, muscle homogenates were administered 10 cm caudal to the injection sites of the oxytetracycline.

Blood was collected into tubes containing heparin lithium from a left-side jugular catheter that had been placed 24 hours before the experiments. Sampling volume was 5 ml in periods 1 and 3 and 8 ml in periods 2 and 4. Samples were centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 minutes at 4 C and plasma was stored at -20 C until analysis. For each period, 3 blood samples were obtained within 2 hours before each administration for estimation of basal plasma CK activity. Time schedule for blood sampling after administration of oxytetracycline was 2, 4, 8, 15, 20, 30, and 45 minutes, and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 hours (period 1); 15, 30, and 45 minutes and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 24, 30, 48, 56, 72, 96, 120, and 144 hours (periods 2 and 4); and 15, 30 and 45 minutes and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 48, 56, and 72 hours (period 3).

Muscle sampling—After induction of anesthesia with xylazine hydrochloride^e (0.2 mg/kg, IM, thigh muscle) and ketamine hydrochloride^f (10 mg/kg, IM, thigh muscle), death was induced by exsanguination. The lumbar areas were rapidly excised and frozen at -20 C. The injection sites were subsequently cut into accurately measured slices 1 to 1.5 cm thick for macroscopic examination. Seven slices of muscle were obtained for each ewe. Two control slices obtained just behind and in front of each injection site were mixed in homogenates as described and used for measurement of basal CK content of longissimus dorsi muscle.

Creatine kinase assay—Activity of CK was assessed in plasma and muscle homogenates according to recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry.⁹ Briefly, an enzymatic kit^g was used. Activity of CK was determined from the increase in absorbance (340 nm) corresponding to NADP reduction measured at 1 minute intervals for 5 minutes with an automated microplate reader.^h The level of quantification was 10 U/L, and the repeatability and reproducibility coefficients of variation (CV) were $< 10\%$.

Local cutaneous temperature measurement—Cutaneous temperature was measured after each IM administration by the same investigator, using an infrared thermometerⁱ positioned vertically above the injection site and the contralateral muscles (control site). The difference between temperatures at these 2 sites was calculated and plotted against time. Five measurements were made at each examination.

Qualitative macroscopic scoring of postinjection muscle damage—Muscle damage for each slice was classified on a visual basis into 4 exclusive categories (no lesion, necrosis, hemorrhage, fibrosis) according to the most predominant lesion. Three investigators performed the classification twice on randomly mixed muscle slices from all the ewes. All the investigators were trained in ultrasonography and in the assessment of postinjection muscle damage. Results of the repeated examinations were used to calculate an index of agreement among and between investigators.

Macroscopic postmortem evaluation of muscle damage—Three investigators measured 29- and 7-day-old lesions twice on randomly mixed slices of muscle from all ewes. The area (A_i) of macroscopically damaged muscle on each slice was calculated from the mathematical product of the height and width measured directly with a graduated ruler. A second method of measurement was used, in which the lesions on each slice were more accurately quantified by computer-assisted analysis.^j This method included a numeric magnification of the slice of muscle on a monitor screen. The enlarged muscle lesion was then evaluated by use of planimetry. Thickness (T_i) was measured for each slice (i), and the entire volume of muscle damage (V_{macro}) was computed for

each site of administration according to the following equation, adapted from a described method¹⁰:

$$V_{\text{macro}} = \sum_i [(A_i + A_{i+1})/2] \times T_i$$

The equivalent mass of macroscopically damaged muscle (M_{macro}) was deduced from the volume and density of the longissimus dorsi muscle with the following equation:

$$M_{\text{macro}} = V_{\text{macro}}/\text{density}$$

Results obtained by use of computer-assisted analysis were used as a reference for comparison with in vivo measurements (ultrasonography, plasma CK activity, and local temperature) performed before euthanasia.

Ultrasonography of the injection site—Standardized echographic examinations were performed on standing ewes, using a portable ultrasonograph⁸ and a 7.5-MHz linear transducer.⁸ The position of the transducer was precisely located on the ewe's back with a permanent drawing on the skin above the site of IM administration. Transmission gel was applied to the transducer and to the skin prior to cross-sectional examination of the muscle. A 1-cm-thick hydrated polyacrylamide-agar sheet⁹ was positioned directly on the skin and used as an aqueous coupling medium to bring the muscle into the focus area of the transducer. After 1 ultrasonographic picture was obtained, measurements were immediately taken with electronic calipers.

Prior to any drug administration, the metrologic properties (precision) of the ultrasonographic procedures were assessed. Each investigator performed 5 repeated examinations on the 5 ewes and measured the size of the lumbar portion of the longissimus dorsi muscles. Variables measured were maximum cross-sectional width, height, circumference, and area of the muscle. After the IM drug administration and development of injury, the ability of the method to detect muscle lesions as well as the precision and accuracy of the ultrasonographic measurements of the lesions from the largest cross-sectional image were assessed. This validation study was conducted 24 hours before euthanasia, with 5 repeated examinations by each of the 3 investigators on each ewe.

Ultrasonography was performed in a blinded manner with the investigators unable to view the figures measured on the screen of the ultrasonograph, and the order of examinations for each sheep was randomized.

Pharmacokinetic analysis of plasma CK activity—Quantification of muscle damage after a single administration of oxytetracycline was performed as described¹¹ by use of non-compartmental analysis of plasma CK activity. Pharmacokinetic analysis was performed with commercial software.¹²

Individual basal plasma CK activity was fixed at the arithmetic mean of the 3 control samples obtained prior to drug administrations. This mean value was subtracted from each plasma CK activity observed after the IM administration. The area under the curve (AUC) for CK activity was calculated by the linear trapezoidal rule without extrapolation to infinity.¹² Bioavailability of CK from muscle (F [%]) and CK plasma clearance (Cl ; [L/kg per minute]) were determined from IV and IM administrations of the muscle homogenate, using the following equations:

$$F = ([AUC_{\text{IM}} \times \text{Dose}_{\text{IV}}]/[AUC_{\text{IV}} \times \text{Dose}_{\text{IM}}]) \times 100$$

$$Cl = \text{Dose}_{\text{IV}}/AUC_{\text{IV}}$$

where AUC_{IM} ($U \times \text{min/L}$) was the AUC after IM administration of the muscle homogenate, AUC_{IV} ($U \times \text{min/L}$) was the

AUC after IV administration of the muscle homogenate, Dose_{IM} (U/kg) was the dose of CK activity administered by the IM route, and Dose_{IV} (U/kg) was the dose of CK activity administered by the IV route. The CK activity in healthy muscle (M [U/g]) was determined in a sample of longissimus dorsi muscle from each ewe. The equivalent quantity of damaged muscle (Q [g]) for each IM injection of drug could be obtained from Cl , AUC_{CK} (AUC of plasma CK activity), F , and M , using the following equation (F was arbitrarily fixed at 100% when exceeded):

$$Q = (Cl \times AUC_{\text{CK}})/(F \times M)$$

Qualitative macroscopic scoring of lesions—Investigators were tested 2×2 for agreement between the 2 repeated scorings for each slice of muscle. This agreement could be defined as the extent of identical scoring between and among the investigators. For interinvestigator agreement, the final score (S_n) for each slice (n) was the sum of a combination of 1 and 0, obtained for each pair of observations:

$$S_n = \sum (1 \text{ if } i = j, 0 \text{ if } i \neq j)$$

where i was the first or second observation of 1 investigator and j was the first or second observation of another of the 2 remaining investigators.

For intrainvestigator agreement, the final score for each slice was the sum (S_m):

$$S_m = \sum (1 \text{ if } k = m, 0 \text{ if } k \neq m)$$

where k was the first observation of 1 investigator and m was the second observation of the same investigator. The S_n and S_m were transformed into categoric percentages of the whole agreement between or among the investigators.

Assessment of accuracy of the measurement methods—For the ultrasonographic measurements (width, height, circumference, and area), the repeatability (intrainvestigator variability) and reproducibility (interinvestigator variability) CV were computed with an ANOVA with 2 random effects, according to the following model:

$$Y_{ijk} = \mu + Op_i + An_j + (Op \times An)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

where Y_{ijk} was the k^{th} value measured for ewe j by investigator i , μ was the mean of the observed values, Op_i was the differential effect of investigator i , An_j was the differential effect of ewe j , $(Op \times An)_{ij}$ was the interaction term, and ϵ_{ijk} was the model error. When no significant interaction occurred, the repeatability CV were calculated with the following equation:

$$CV_{\text{repeatability}} (\%) = (SD_e/\mu) \times 100$$

where SD_e was the SD for the residual term. Unbiased reproducibility CV were then computed with the following equation:

$$CV_{\text{reproducibility}} (\%) = (SD_{\text{investigator}}/\mu) \times 100$$

The unbiased SD for the investigator effect,

$SD_{\text{investigator}}$ was obtained with equation:

$$SD_{\text{investigator}}^2 = ([MS_{\text{investigator}} - SD_{\epsilon}^2] / [n \times p])$$

where $MS_{\text{investigator}}$ was the mean square of the deviation from the mean, given by the ANOVA; n was the number of measurements performed per animal and per investigator; and p was the number of ewes.

For macroscopic examination, the precision of the measurement approach was similarly evaluated via CV for repeatability and reproducibility, considering the slice of muscle factor instead of the ewe factor in the statistical model described for ultrasonography; all slices from the different ewes were randomly pooled for macroscopic examination. For cutaneous temperature, a CV for repeatability was calculated in the same manner to evaluate the precision of the method; the model included 2 random effects (ewe and postinjection time) and their interaction.

An ANOVA with the factor ewe was performed to test for the effect of individuals on the AUC of CK obtained after the 2 administrations of oxytetracycline and on the equivalent quantities of muscle determined by the different methods. Tukey multiple comparisons were performed post hoc. Quantity of muscle damage in periods 2 and 4 estimated with all the methods was compared with a Student paired t -test.

A 95% confidence interval (CI) was constructed for the mean ultrasonographic area of muscle damage at each time of observation. When the value 0 was included in the 95% CI, it was concluded that no muscle damage could be detected with ultrasonography.

Intermethod comparison—The muscle slices had 7-day-old (left side) and 29-day-old (right side) postinjection lesions. Correlation between results obtained with noninvasive methods and planimetric image analysis of the lesions was computed.

Significance was set at $P < 0.05$; results were expressed as mean \pm SD. All statistical analyses were

performed with commercial software.⁹

Results

Clinical signs—Mild signs of localized pain and swelling were seen in all ewes immediately after IM administration of oxytetracycline.

Local cutaneous temperature—The $CV_{\text{repeatability}}$ was 0.7%. A biphasic temperature pattern was observed in all ewes after IM administration of oxytetracycline, with an initial hypothermic phase followed by a hyperthermic curve (Fig 1). Maximum decrease in temperature was -3.9 ± 0.62 °C, which occurred at 8.4 ± 12.07 minutes. Maximum increase in temperature was 3.1 ± 1.35 °C, which occurred at 57 ± 36 hours. No relationship was detected between temperature profiles and the extent of observed muscle damage.

Macroscopic postmortem evaluation of muscle damage—Fibrosis, necrosis, and hemorrhage (Fig 2) were observed in 66, 32, and 2%, respectively, of the 29-day-old lesions and in 16, 31, and 53%, respectively, of the 7-day-old lesions. Interinvestigator agreement was 100% for 53% of the slices and at least 50% for 69.6% of the slices. Intrainvestigator agreement was 100% for 57.6% of the slices, at least 50% for 66.7% of the slices, and 0% for 21% of the slices.

Estimated $CV_{\text{repeatability}}$ and $CV_{\text{reproducibility}}$ for the direct macroscopic visual measurement of the damaged area were 47.6 and 34.5%, respectively. Results obtained by use of direct macroscopic measurement and planimetry were correlated, with $R^2 = 0.72$. Mean size of 7-day-old lesions (12.1 ± 4.96 g) was significantly ($P = 0.04$) different from that of the 29-day-old lesions (4.8 ± 1.89 g), as estimated by use of planimetric image analysis; this difference was not significant ($P = 0.14$), as estimated by use of visual macroscopic measurements (7.3 ± 3.45 g and 4.0 ± 2.21 g for 7- and 29-day-old lesions, respectively).

Ultrasonography of the injection site—Muscle

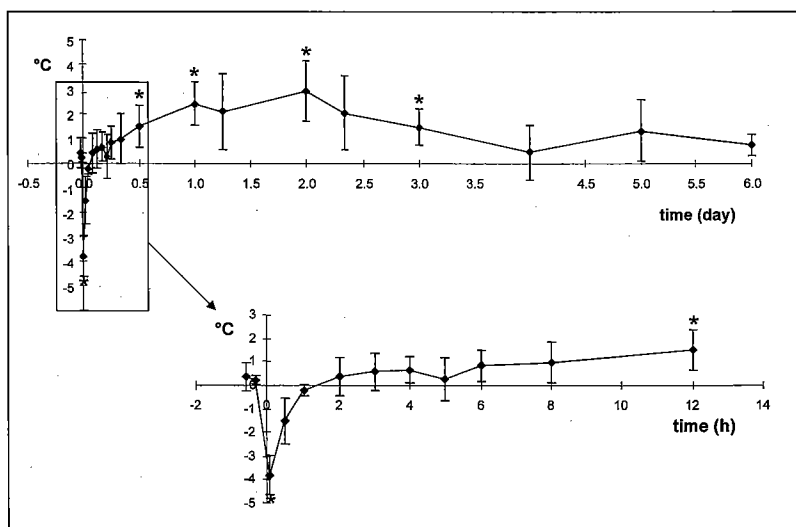


Figure 1—Time course of cutaneous temperature (mean \pm SD) differential between an injection site and a control site after IM administration of a 20% formulation of long-acting oxytetracycline (20 mg/kg of body weight) in 5 ewes at time 0. *Significantly ($P < 0.05$) different from control site.

lesions appeared as hyperechoic areas in the middle of the muscle belly (Fig 3). The $CV_{\text{repeatability}}$ and $CV_{\text{reproducibility}}$ for measurements of the control muscle and muscle lesions were determined (Table 1). After euthanasia, postinjection muscle lesions were clearly apparent at each site of administration. Lesions were detected in 32% of the ultrasonographic examinations performed by the first investigator, 48% of the examinations performed by the second investigator, and 100% of the examinations performed by the third investigator.

Ultrasonography gave a 2.5- to 5.3-fold underestimate of the actual area of the lesions assessed by use of planimetry, depending on the ewe. Many discrepancies between values obtained with the 2 techniques on various days and from individual ewes were observed and could not be explained. Mean lesion measurement by use of ultrasonography was not significantly different from 0 except at 9 and 24 hours after the IM adminis-

tration, as shown by the 95% CI, which implied that ultrasonography did not detect any lesion except at the 2 noted times.

Pharmacokinetic analysis of plasma CK activity—Mean basal CK activity was 27 ± 15.9 U/L and ranged from 16 to 48 U/L. Mean CK activity in control muscles was $2,300 \pm 403.9$ U/g with a range of 1,621 to 2,601 U/g.

Noncompartmental analysis of CK activity after IV bolus administration of muscle homogenate gave a CK clearance of 0.4 ± 0.17 ml/kg per minute. The apparent mean bioavailability of exogenous CK from muscle after IM administration of the CK solution was $106 \pm 31.7\%$, with a range of 73 to 149%.

The C_{max} of plasma CK activity after IM administration of oxytetracycline was correlated to the non-compartmental AUC ($R^2 = 0.84$). From CK release, the equivalent amount of muscle damage during periods 2 and 4 after a single IM administration of oxytetracycline was 10.7 ± 4.59 g. The amount of muscle damage did not differ significantly ($P = 0.97$) between the 2 IM administrations (period 2, 10.7 ± 5.85 g; period 4, 10.8 ± 3.64 g). A linear regression was computed between results obtained by use of pharmacokinetic analysis of CK release and planimetric image analysis of the dam-

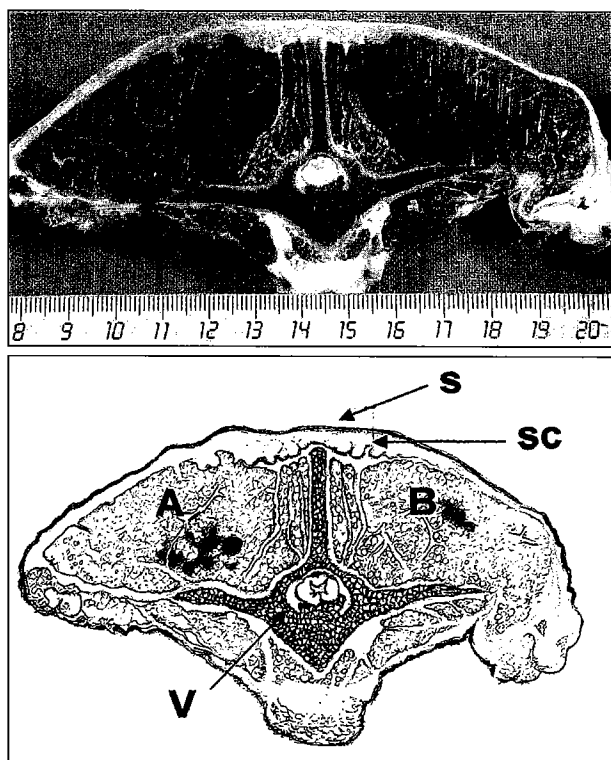


Figure 2—Photograph (top) and diagram (bottom) of muscle slice from a ewe with 29-day-old (A) and 7-day-old (B) muscle lesions after 2 successive IM administrations of a 20% formulation of long-acting oxytetracycline (20 mg/kg) on day 0. S = Skin. Sc = Subcutaneous tissue. V = Vertebra. Ruler indicates centimeters.

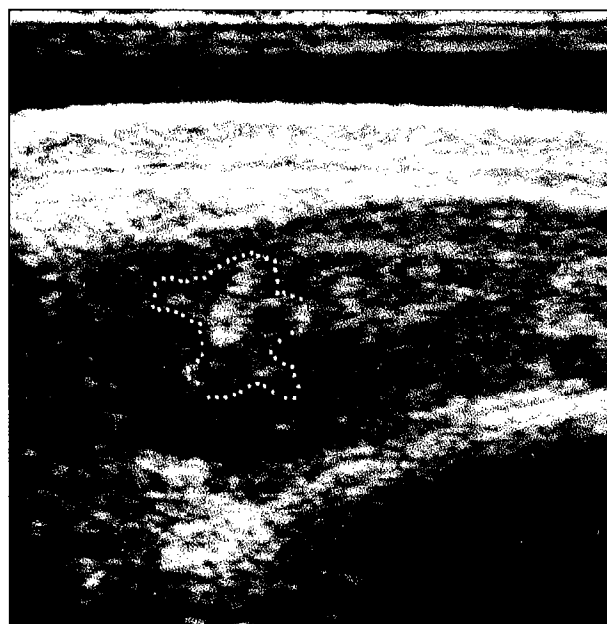


Figure 3—Transverse ultrasonographic image of a muscle from a ewe 2 days after IM administration of oxytetracycline. Dotted line delineates muscle lesion.

Table 1—Coefficients of variation for repeatability and reproducibility of ultrasonographic measurements on longissimus dorsi muscle in 5 ewes obtained by 3 operators on normal muscle and muscle lesions induced by a single IM administration of a 20% formulation of long-acting oxytetracycline (20 mg/kg of body weight)

Variable	Control		Lesions	
	Repeatability (%)	Reproducibility (%)	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
Height	6.1	1.6	51.4	92.0
Weight	5.6	6.6	66.7	70.0
Area	9.5	4.1	61.4	101.4
Circumference	5.0	2.6	60.9	81.9

age; the 2 methods of damage evaluation were in agreement.

Discussion

Sheep were used as a model in the study reported here, because they represent a target species and are convenient for handling, blood volume is not a limiting factor for pharmacokinetic studies, and the basal CK is stable,¹³ compared with pigs¹⁴ and rabbits,¹⁵ in which a stress-induced increase in plasma CK is observed. A long-acting formulation of oxytetracycline was used, because it induces postinjection lesions in sheep, pigs, and cattle.² Despite its nonuse in current management of food animals, the selected site of administration in the longissimus dorsi muscle guarantees strict IM deposit of the drug without dispersion into the muscular fascial sheaths, as described in dogs.¹⁶ It also permits adequate standardization of the ultrasonographic examination without disturbing the animals, appropriate conditions for local temperature assessment, and easy delimitation and removal of the whole injection site after euthanasia.

According to current recommendations, assessment of postinjection muscle damage is only made on the basis of clinical recordings and pathologic examination. In this study, only slight swelling and transient pain at the injection site were observed.

Cutaneous temperature was measured above the injected muscles to monitor the time course of the local inflammatory response. Although local temperature could not be used to evaluate the extent of muscle damage, the biphasic temperature profile observed in all the ewes led to 1 hypothesis on the pathophysiologic mechanisms of postinjection muscle damage. Hypothermia could be related to a transient local decrease in blood flow consecutive to a compression of muscle bundles and capillaries attributable to the volume and viscosity of the injected material or to reflex vasoconstriction. Hyperthermia could result from reperfusion flow and inflammatory vasodilatation. The successive occurrence of vasoconstriction and vasodilatation could be related to the ischemia-reperfusion syndrome.

Macroscopic examination of muscle damage after slaughter is the current method used to assess the irritancy of different drugs after IM administration. Often, only a single section of affected muscle is examined, and the lesion is assessed according to a scoring system. Lack of standardization of the entire process leads to numerous problems, including inexact location of the site of administration in vivo on the animal, inconsistency in the number of sections obtained from the injection site, and use of many scoring and scaling systems. These are qualitative or semiquantitative, which makes them difficult to analyze for the comparison of different drugs. In the study reported here, the damaged area, determined by use of direct measurement of height and width on the slices, was correlated with results of computer-assisted planimetry. The CV for repeatability and reproducibility indicated that this approach is not sufficiently precise for quantification and should be validated prior to any use, as for any assay in which the CV should be < 15%.¹⁷ A basic rec-

ommendation could also be that the same investigator, whose intra- and interday variation should be known, should perform the measurements. Similar comments could apply to qualitative assessment. In our study, the macroscopic examination of 7-day-old lesions with predominance of hemorrhage and 29-day-old lesions with predominance of fibrosis was in agreement with the usual description of the development of postinjection muscle damage. This classification was much simpler than the other scoring systems, which are used without validation.¹⁸ A validation is provided here, with an estimation of repeatability and reproducibility of the method of classification. In 21% of the examinations, there was not any repeatability; the classification was different between 2 successive scorings for all the investigators.

The ultrasonographic approach was also tested, because it was apparent that macroscopic morphologic examination and imaging may give similar information. Ultrasonography of the injection site has been proposed as a promising means of continuously assessing the development, nature, and extent of muscle lesions during the period of drug-induced damage and the healing period.¹⁹ In our experiment, this approach was subjected for the first time to a validation process for its use in quantitative evaluation of postinjection muscle damage. In vivo measurements were compared with direct postmortem examination results. Ultrasonography appears to be reliable for noninvasive prediction of carcass composition, especially for fat and longissimus dorsi muscle measurement in cattle²⁰ and sheep.²¹ Indeed, in our study, ultrasonography had good intrinsic measurement properties, with repeatability and reproducibility CV of 9.5 and 4.1%, respectively, for measurements of the longissimus dorsi muscle area prior to drug administration. In a descriptive study of the ultrasonographic appearance of the structures of the ventral neck region in cattle, the interassay CV, ranging from 3.0 to 12.3%, were quite similar to our results.²² The ultrasonographic method was reliable for the assessment of dimensions in healthy muscle, but validation could not be extrapolated to damaged muscle. On cross-sectional imaging of normal muscle, the fibro-adipose septae were echogenic, and the muscle bundles were hypoechoic, resulting in a "starry sky" appearance for the whole muscle, which has been described.²³ Our repeated examinations had a sensitivity of 60% for detection of muscle lesions, which is less than that of previous studies in which sensitivity was 82.9% for diagnosis of inflammatory myopathies in humans.²⁴ When lesions were detected in our study, ultrasonography provided inaccurate measurements of the damaged area, with unacceptable CV for precision and a systematic 2-fold underestimation of the size of the actual lesion, as determined by use of planimetry. In fact, hyperechogenic zones were seen in the muscle and were interpreted to be muscle lesions, but these zones were sometimes multifocal or diffuse areas, which made delimitation of the damage difficult. Conflicting observations concerning the echogenic changes in muscle lesions have been reported; echogenicity has been reported to increase²³ or decrease²⁴ with edema. The wide range of ultrasono-

graphic findings in muscle makes detection of postinjection lesions difficult and highly dependent on the investigator. Ultrasonography does not appear to be a reliable tool for the assessment of postinjection muscle damage and will underestimate the actual size of the lesion.

Pharmacokinetic analysis of CK has been used to assess local tolerance to different formulations in cattle,²⁵ dogs,²⁶ horses,²⁷ and sheep^{13,28} but had not been validated for accuracy. To the authors' knowledge, this study is the first to reveal positive correlation between the equivalent amount of muscle, determined ante-mortem by use of noncompartmental pharmacokinetic analysis of CK, and the quantity of macroscopically damaged muscle, measured by use of computer-assisted planimetry after euthanasia. The mean mass of muscle damage was within the range of previous calculations in sheep, in which the lesion represented between 1.4 and 83.3 g, depending on the administered oxytetracycline formulation.²⁸ Some authors have used plasma CK activity at specified times after injection,²⁹ C_{max} values,³⁰ or AUC of CK to compare tolerance for different formulations.²⁵ In the latter study, the amount of muscle damage in lactating cows after IM administration of flunixin and phenylbutazone at the recommended dose was approximately 80 g. Computing the AUC of CK may be used to compare tolerance to different formulations or drugs administered to the same individuals in a crossover design study, because the AUC in the same sheep in our study were not significantly different between 2 successive administrations of the same drug. Peak value for plasma CK activity may also be used for rough comparisons, because our results indicated that C_{max} and AUC were correlated. However, differences in absorption or elimination processes between individuals may result in important sources of variation in plasma CK activity or AUC, leading to misinterpretation of tolerance to the formulations. In other words, determination of plasma clearance and bioavailability from muscle is desirable to correctly estimate the amount of muscle damage estimated by use of AUC. Determination of clearance, bioavailability, and CK content of normal muscle allows accurate estimation of the actual amount of muscle damage. The CK clearance in our study was consistent with the plasma CK clearance of 0.3 ± 0.12 ml/kg per minute computed in a previous study.¹³ Systemic bioavailability of CK from muscle exceeded 100% in 2 of the 5 ewes in our study, which may have resulted from partial injury of the muscle cells after IM administration of the exogenous CK solution, leading to a release of endogenous CK. The computed mean bioavailability of CK from muscle was 31% in rabbits,³¹ 42% in sheep,²⁸ 51% in cattle,⁸ and 75% in horses.³² The CK activity in normal lumbar muscle assessed in this study on 5 adult ewes was $2,300 \pm 403$ U/g. The CK results obtained previously were between 3,941 and 5,940 U/g in triceps brachialis and quadriceps femoralis, respectively, but were only obtained from a single 6-month-old lamb.²⁸ In cattle, the CK activity in neck muscle was reported to be $2,860 \pm 796$ U/g,⁸ which is similar to our results in sheep. Quantitative assessment of muscle damage by use of pharmacoki-

netic analysis of CK rather than AUC is more appealing in terms of potential economic loss, because the estimated weight of the damaged muscle is expressed. A similar approach indicated that the damage resulting from an IM administration of imidocarb to a 12-kg dog was equivalent to approximately 3 g of muscle.²⁶

Our results indicated that presently used morphologic approaches^{4,5} may lead to misinterpretations in local tolerance testing. Planimetry should be recommended, although it is tedious and time consuming. Ultrasonography, a noninvasive approach, is not reliable for quantification of muscle damage. Pharmacokinetic analysis of CK release provides a noninvasive and accurate method of quantifying postinjection muscle damage. It can therefore be recommended, especially in companion animals for which macroscopic examination requiring euthanasia is a critical ethical issue, because no residue study is necessary. When individual CK pharmacokinetic values are not available, however, the AUC alone may be used for comparison of several formulations in the same animals.

^aSvendsen O. *Study of tissue injuries caused by intramuscular injection of drugs and vehicles*. PhD Thesis, Medical Faculty, University of Copenhagen, Denmark, 1988.

^bRumina Broutard, Duquesne Purina, Valence d'Agén, France.

^cTerramycin LA, Pfizer santé animale, Orsay, France.

^dDelvo, Bienne, Switzerland.

^eRompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany.

^fImalgene 1000, Merial, Marcy l'Etoile, France.

^gEnzyline CK, Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France.

^hmQuant and KC4 software, Bio-Tek Instruments, Winooski, Vt.

ⁱModel 310, Everest Interscience, Tucson, Ariz.

^jVisiolab 2000, Biocom, Les Ulis, France.

^kScanner 100, Pie Medical Equipment, Maastricht, The Netherlands.

^lGeistlich, Wolhusen, Switzerland.

^mWinonlin 1.1, Scientific Consulting Inc, Apex, NC.

ⁿSystat 8.0, SPSS Inc, Chicago, Ill.

References

- George MH, Tatum JD, Smith GC, et al. Injection site lesions in beef subprimals: incidence, palatability, consequences and economic impact. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1997;19:S84-S93.
- Nouws JFM, Smulders A, Rappalini M. A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. *Vet Q* 1990;12:129-138.
- Van Alstine WG. Porcine sciatic nerve damage after intramuscular injection. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1988;10:1329-1332.
- Office of New Animal Drug Evaluation. *Target animal safety guidelines for new animal drugs*. Rockville, Md: Food and Drug Administration: Center for Veterinary Medicine, 1989.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *Evaluation of the safety of veterinary medicinal products for the target animals*. Vol 7A. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1994.
- Ladage CA, van Walstijn ThA, van Riessen HA. Comparative macroscopic evaluation of muscle damage in rats and in cattle after intramuscular administration of some commercially available injectable medicines, in *Proceedings*. 1st Eur Assoc Vet Pharmacol Toxicol Congr 1979;34-40.
- Tittes-Rittershaus V, de Vries H, de Jong H. Local reaction studies in rabbits and dogs, in *Proceedings*. 1st Eur Assoc Vet Pharmacol Toxicol Congr 1979;41-46.
- Lefebvre HP, Toutain PL, Serthelon JP, et al. Pharmacokinetic variables and bioavailability from muscle of creatine kinase in cattle. *Am J Vet Res* 1994;55:487-493.
- Horder M, Jorgensen PJ, Halkenscheid JC, et al. Creatine kinase determination: a European evaluation of the creatine kinase

determination in serum, plasma and whole blood with the Reflotron system. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:691–696.

10. Löw O, Machnik G, Simon G, et al. Studies on quantitative morphology. II. A stereological method for examination of local tissue injury following intramuscular injection. *Exp Pathol* 1973; 8:128–136.

11. Lefebvre HP, Laroute V, Braun JP, et al. Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release. *Vet Res* 1996;27:343–361.

12. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. 2nd ed. Basel, Switzerland: Marcel Dekker, 1982;445–449.

13. Houpert P, Serthelon JP, Lefebvre HP, et al. In vivo non-invasive quantification of muscle damage following a single administration of phenylbutazone in sheep. *Vet Hum Toxicol* 1995;37:105–110.

14. Steiness E, Rasmussen F, Svendsen O, et al. A comparative study of serum creatine phosphokinase (CPK) activity in rabbits, pigs and humans after intramuscular injection of local damaging drugs. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1978;42:357–64.

15. Lefebvre HP, Jaeg JP, Rico AG, et al. Variations of plasma creatine kinase in rabbits following repetitive blood sampling: effects of pretreatment with acepromazine, carazolol and dantrolene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:425–428.

16. Autefage A, Fayolle P, Toutain PL. Distribution of material injected intramuscularly in dogs. *Am J Vet Res* 1990;51:901–904.

17. Food and Drug Administration. *Bioanalytical methods validation for human studies*. Rockville, Md: USDA: Food and Drug Administration, 1998.

18. Nouws JFM. Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs. *Vet Q* 1984;6:80–84.

19. Banting A, Baggot JD. Comparison of the pharmacokinetics and local tolerance of three injectable oxytetracycline formulations in pigs. *J Vet Pharmacol Ther* 1996;19:50–55.

20. Robinson DL, McDonald CA, Hammond K, et al. Live animal measurement of carcass traits by ultrasound: assessment and accuracy of sonographers. *J Anim Sci* 1992;70:1667–1676.

21. Russel AJF. Ultrasonography and body composition in

sheep. In: Goddard PJ, ed. *Veterinary ultrasonography*. Cambridge, England: Cab International, 1995;315–323.

22. Braun U, Föhn J, Pusterla N. Ultrasonographic examination of the ventral neck region in cows. *Am J Vet Res* 1994;55:14–21.

23. Van Holsbeeck M, Introcaso JH. Musculoskeletal ultrasonography. *Radiol Clin North Am* 1992;30:907–925.

24. Reimers CD, Fleckenstein JL, Witt TN, et al. Muscular ultrasound in idiopathic inflammatory myopathies of adults. *J Neurol Sci* 1993;116:82–92.

25. Pyörälä S, Laurila T, Lehtonen S, et al. Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole. *Acta Vet Scand* 1999;40:145–150.

26. Aktas M, Vinclair P, Lefebvre HP, et al. In vivo quantification of muscle damage in dogs after intramuscular administration of drugs. *Br Vet J* 1995;151:189–196.

27. Toutain PL, Lassourd V, Costes G, et al. A non-invasive and quantitative method for the study of tissue injury caused by intramuscular injection of drugs in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 1995;18: 226–235.

28. Verlinde V, Mikaelian I, Laurentie M, et al. Biodisponibilité de la créatine kinase musculaire chez le mouton. Application à l'évaluation de la tolérance locale de formulations vétérinaires injectables. *Vet Res* 1996;27:133–146.

29. Nosaka K, Sakamoto K. Changes in plasma enzyme activity after intramuscular injection of bupivacaine into the human biceps brachii. *Acta Physiol Scand* 1999;167:259–265.

30. Sidell FR, Culver DL, Kaminskis A. Serum creatine phosphokinase activity after intramuscular injection. The effect of dose, concentration, and volume. *JAMA* 1974;229:1894–1897.

31. Hsu H, Watanabe J. The absolute bioavailability of rabbit muscle creatine phosphokinase after intramuscular administration. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1984;32:1922–1928.

32. Volfinger L, Lassourd V, Michaux JM, et al. Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released. *Am J Physiol* 1994;266:R434–R441.

B. Etude 2 - Application et conséquence pharmacocinétique (Article 2)

Problématique :

Lorsqu'une formulation très irritante est utilisée, le principe actif est déposé dans une zone musculaire qui est modifiée très rapidement. Les tissus se nécrosent et les communications vasculaires sont modifiées. L'étendue de la lésion peut ainsi vraisemblablement modifier ou retarder l'absorption du principe actif.

Objectifs : Induire des lésions de tailles variables à l'aide de volumes croissants d'une formulation irritante chez la brebis.

Après la quantification des lésions par l'analyse de la concentration d'activité CK plasmatique libérée, évaluer la biodisponibilité du principe actif pour chaque volume administré. Caractériser ensuite l'influence de lésions iatrogènes de tailles variables sur la biodisponibilité du principe actif.

Matériels et méthodes : Des lésions musculaires iatrogènes ont été induites chez 6 brebis par administration IM de trois volumes (2, 4 et 8 mL) d'une formulation irritante de phénylbutazone à 20 %. Les administrations ont été réalisées dans les muscles *Longissimus dorsi* gauche et droit en un plan expérimental croisé (crossover). Après chaque administration IM, les concentrations d'activité CK plasmatique et les concentrations plasmatique de phénylbutazone ont été mesurées au cours du temps. Les lésions musculaires ont été évaluées par analyse pharmacocinétique non-compartimentale de la CK. Une cinétique de phénylbutazone administrée par voie intraveineuse a été aussi réalisée chez les mêmes animaux pour permettre le calcul de la biodisponibilité absolue de la phénylbutazone à partir du muscle.

Résultats : La lésion musculaire estimée par l'analyse pharmacocinétique de la CK augmente de façon proportionnelle au volume de la formulation administrée dans le muscle.

Les résultats de l'analyse pharmacocinétique de la phénylbutazone montrent qu'il n'y a pas eu de modification entre les différents volumes administrés. La biodisponibilité absolue était de 100 ± 32 , 96 ± 19 et 100 ± 17 % pour 2, 4 et 8 mL. La valeur du C_{\max}

Etude expérimentale

était proportionnelle au volume de PBZ, avec 42 ± 3.4 , 74 ± 8.8 et 119 ± 18.2 pour 2, 4 et 8 mL. Dans ce modèle, il n'y a pas eu d'effet de l'étendue lésionnelle sur l'absorption du principe actif administré par voie intramusculaire.

Article 2 :

Effect of the volume injected of a phenylbutazone formulation on muscle bioavailability and tolerance in sheep

Ferre PJ, Laroute V, Braun JP, Cazaux J, Toutain PL, Lefebvre HP.

Rédaction en cours

UMR 181 INRA/ENVT Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales, National Veterinary School of Toulouse, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 03, France

Introduction

The intramuscular (i.m.) route is the major parenteral route in veterinary medicine, especially in food animals. Its main advantages compared to the oral route is that substance with poor oral bioavailability may be administered, the nominal dose is actually given, the dosage regimen is easier to adjust, and it allows a more rapid drug effect and modulation of effect duration (for example, short- vs long-acting formulation). Tissue damage induced by intramuscular administration of drugs remains however a critical issue in drug development and in food animal production. In the 90s, such muscle blemishes were shown to be responsible for important economical losses in US slaughterhouses. The prevalence of lesions in beef top sirloin butts was about 10% and the loss has been estimated to about \$5 per damaged site (Dexter, Cowman et al. 1994). In 2001, the prevalence of lesions in beef round butts was estimated to about 11,3% (Roeber, Cannell et al. 2001). Specific guidelines for techniques of intramuscular administration has been edited by the National Cattlemen's Association to reduce the prevalence of meat trims due to post-injection muscle damage. It is clear however that development of well-tolerated formulations by pharmaceutical companies remains the best strategy to limit the incidence of post-injection blemishes.

Formulation-dependent factors causing muscle damage after i.m. administration have been previously identified. The drug itself is often irritating. In humans, about 70% of 107 different injectable drugs were shown to have cytotoxic properties (Oshida, Degawa et al. 1979). Local tolerance depends also on the nature of the excipients in the formulation. For example, oily vehicles are better tolerated than aqueous ones (Dickson, Hopkins et al. 1986). The concentration of drug and excipients, and the volume injected are other factors affecting the extent of muscle damage. Higher the

volume injected or the concentration of the formulation, higher the extent of the local damage (Nouws 1984). Finally, there is no simple way to predict the local tolerance of a formulation from its components.

Some interesting *in vitro* and *ex vivo* alternatives have been developed, but *in vivo* tolerance testing remains necessary. Local tolerance of veterinary drugs is generally assessed by macroscopic examination of muscle after euthanasia or slaughtering of target animals, as stated in the current US (Office of New Animal Drug Evaluation, 1989) and European (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1994) guidelines. The drawbacks of such an approach are nevertheless numerous : i) these approaches are at best semi-quantitative and most often qualitative based on highly subjective scoring systems which differ considerably in the literature and therefore impair any comparison between the different results published, ii) euthanasia of a large number of animals is needed, which represents an ethical issue and may increase the cost of the study; such expensive investigations are generally performed in food animals with residue studies, that is at the end of drug development, while they would be more useful as screening test at earlier stages of the development, and iii) pharmacokinetic studies cannot be performed on the same occasion because groups of animals are euthanatized at fixed time and it is not possible to compare on the same animal the local tolerance of different formulations of the same drug, and to assess simultaneously the influence of formulation on drug pharmacokinetics. For example, local muscle damage may affect drug bioavailability, and consequently residues (Nouws and Vree 1983).

In sheep, some local tolerance testing studies have been published for oxytetracycline (Nouws, Smulders et al. 1990), vitamins (Behrens, Matschullat et al. 1975; Dickson, Hopkins et al. 1986), chloramphenicol (Dagorn, Guillot et al. 1990),

piroplasmicid drugs (Mitema 1985) and phenylbutazone (Houpert, Serthelon et al. 1995). Although the economic impact of post-injection muscle damage has not been evaluated in sheep, it is probably not negligible because of meat, but also fleece/mopblemishes. The effect of volume injected on local tolerance and muscle bioavailability has never been documented in sheep.

The aim of this study was to illustrate the relevance of a new non invasive technique previously proposed (Lefebvre, Laroute et al. 1996) and recently validated (Ferre, Concordet et al. 2001) in sheep for quantitation of muscle damage following intramuscular administration, and to assess the effect of different volumes administered on both the local tolerance and the drug bioavailability in the same animals.

Materials and Methods

Animals

Six adult Lacaune ewes weighing 76 ± 9.0 kg at the beginning of the study were acclimated to the experimental conditions for 15 days. During the pharmacokinetic studies, the ewes were placed in individual cages. They were daily observed, fed with hay and pellets (300g) and provided with fresh water *ad libitum*. All the experiments were performed according to the current guidelines for the use and care of laboratory animals. Before each drug administration, the body weight was determined. Except PBZ, no other treatment was used during the study.

Experimental design

The ewes were divided into three groups of two animals for a 3-period cross-over design. On each period, each ewe received three i.m. administrations with a different volume per administration. The washout period was 3 to 4 weeks between two consecutive administrations. After each administration, blood was sampled to determine plasma PBZ and CK activity concentration. Five months after the end of the cross-over design, an i.v bolus administration of PBZ was performed to determine the pharmacokinetic parameters of PBZ in each ewe;

Administrations of PBZ

A commercially available formulation of 20% PBZ was used (Phenylarthrite[®], Vetoquinol, Lure, France) for the intravenous and the intramuscular administrations. Three volume of PBZ were administered: 2, 4 and 8 mL. The intramuscular administrations were performed between 8 and 10 a.m. in the *Longissimus dorsi* muscle. Three sites of injection within the muscle were selected as follows: At 4 cm

lateral from the spinal crest, and at 1/ 7 cm 2/ 13 cm and 3/ 19 cm in front of the iliac crest. The sites were injected so that each site received a volume of the formulation which was different between each group of animals. Each site was injected only once. Intramuscular administrations were performed with a 1.1x40 mm needle. The day before, the hair was clipped and just before administration, the skin area was disinfected with 70° alcohol.

Intravenous administration was performed through an indwelling catheter placed in the left jugular vein the day before dosing. The catheter was flushed with saline after the administration of PBZ, and then removed.

The speed of i.m. administration was about 5, 10 and 20 s for the 2, 4 and 8 mL volumes of PBZ, respectively. The corresponding doses administered were 5.2 ± 0.53 , 10.5 ± 1.11 and 21.3 ± 2.44 mg/kg, respectively. The intravenous dose of PBZ was 8.0 ± 0.08 mg/kg.

Blood sampling

An indwelling catheter was placed in the right jugular vein the day before the kinetics and was rinsed three times a day with heparinized saline. Before each sampling, one mL of blood was sampled and discarded. Then, 4 mL were collected and then 2-mL of heparinized saline was administered. Catheter was removed after the last blood sampling on each period. Three blood samples were performed 60 and 30 min, and just before administration. The blood sampling times after administration were 15, 30, 45, and 60 min, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, and 32 h, 2, 3, 4, and 5 days.

After sampling, blood was placed at 4°C in a heparinized tube, and centrifuged within 30 minutes (3,000 g, 10 min). Plasma was divided into 3 aliquots and stored at –20°C until assay.

Assays

Creatine kinase (CK) activity was measured at 30°C with commercially available reagents (Enzyline CK, ref 63151, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) on a Roche Cobas Bio analyzer. The limit of quantitation was 2 U/L. Quality control was based on pooled animal sera; coefficients of variation for between-series precision were less than 4.5%. Plasma concentrations of phenylbutazone and its main metabolite, oxyphenylbutazone (OPBZ), were determined by HPLC. Internal standard (nimesulide), PBZ and OPBZ were extracted from plasma by a precipitation procedure with acetonitrile. The HPLC apparatus consisted of a pump system equipped with an automatic injector and an ultraviolet detector (254 nm). Separation was achieved by reverse phase column (Lichrospher C₁₈, 6 µm, 125 x 4.0 mm) using a guard column. The mobile phase was constituted of a 40:60 (v/v) mixture of 2% acetic acid /methanol and was used at a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹. The within and between-day precision parameters were lower than 15 %. The accuracy ranges were 99-109% for PBZ and 103-110% for OPBZ. The quantitation limits of the assay were 0.25 µg.mL⁻¹ for PBZ and 0.20 µg.mL⁻¹ for OPBZ.

Pharmacokinetic analysis of PBZ

Pharmacokinetic analysis was performed by a non-compartmental approach using a pharmacokinetic software package (WinNonLin 3.0, Pharsight corp, Mountain View, CA).

The maximal plasma concentration of PBZ (C_{max}) and its time of occurrence (T_{max}) were determined from observed values.

Area under the plasma concentration vs time curve (AUC) of CK and PBZ and OPBZ were calculated using the linear trapezoidal rule with extrapolation to infinity, the extrapolated area representing less than 15% of the total AUC. Elimination half-lives were estimated by log-linear regression from the terminal phase.

PBZ systemic availability from muscle (F, %) and PBZ plasma clearance (Cl, mL.min⁻¹.kg⁻¹) were determined from IV and IM administration of the PBZ formulation using the equations (1) and (2) :

$$F = \frac{AUC_{im} \times Dose_{iv}}{AUC_{iv} \times Dose_{im}} \times 100 \text{ (eq 1)}$$

$$Cl = \frac{Dose_{iv}}{AUC_{iv}} \text{ (eq 2)}$$

AUC_{im} (µg.min.mL⁻¹), AUC_{iv} (µg.min.mL⁻¹), Dose_{im} (µg.kg⁻¹), Dose_{iv} (µg.kg⁻¹) are respectively the area under plasma PBZ concentration curve after IM administration, the area under plasma PBZ concentration curve after IV administration, the dose of PBZ administered by the IV route and the dose of PBZ administered by IM route.

Estimation of muscle damage from plasma CK activity

Muscle damage due to i.m. administration of PBZ was determined as previously described (Lefebvre, Laroute et al. 1996). Basal plasma CK activity was determined for each animal with the arithmetic mean of the three control samples obtained prior to the IM administrations of PBZ. This mean value was subtracted to CK activities observed after each IM administration (superposition principle). The amount (A, expressed in g of damaged muscle per kg of body weight) was calculated by the following equation, according to Ferré et al. (Ferre, Concordet et al. 2001):

$$A = \frac{Cl \times AUC_{CK}}{F \times M} \text{ (eq 3)}$$

with AUC_{CK} , (U.min/h) the AUC of plasma CK activity (subtracted of the mean basal value) concentration vs time profile following i.m. administration of PBZ. The value of Cl (L/kg/h), the plasma clearance of CK, F (%), the muscle bioavailability of CK and M (U/g of muscle), the muscle content of CK, were those previously determined in ewes in our laboratory (Ferre, Concordet et al. 2001), so that the value of $\frac{Cl}{F \times M}$ was fixed to $10.4 \cdot 10^{-6}$ g.L/U/kg/h.

Statistics

Results are presented as mean \pm SD unless otherwise stated. The following general linear model (ANOVA) was used for statistical analysis (Systat 10.2, SPSS Inc, Chicago, Ill):

$$Y_{i,j,k,l} = \mu + \text{Volume}_i + \text{Period}_j + \text{Group}_k + \text{Animal}/\text{Group}_k + \varepsilon_{i,j,k,l}$$

With $Y_{i,j,k,l}$, the explained variable (AUC, C_{max}), μ the mean effect, Volume_i the volume effect ($i=2, 4$ or 8 mL), Period_j the period effect ($j=1, 2$ or 3), Group_k the group effect, $\text{Animal}/\text{Group}_k$ the animal effect ($l=1$ to 6) nested in each group ($k=1, 2$ or 3), and $\varepsilon_{i,j,k,l}$ the residual error. The injection sites being located in the same muscle, the site effect was considered negligible.

Results

Plasma CK activity

Plasma profiles of plasma CK activity vs time are shown in figure 1. AUC, Tmax and Cmax of plasma CK activity after IM administrations of 2, 4 and 8mL of PBZ are shown in table 1.

The AUC and the observed Cmax for plasma CK activity increased respectively 2.1 and 2.4 between the low and medium volume of PBZ, and 4.9 and 5.1-fold between the low and the highest volume of PBZ administered ($p<0.05$ and $p<0.01$ for log-transformed AUC and log-transformed Cmax, respectively). The corresponding amounts of equivalent of muscle damaged (in g per kg of body weight) were 0.51 ± 0.533 , 1.08 ± 0.893 , and 2.54 ± 3.032 for the volume of 2, 4 and 8 mL of PBZ, respectively. In other terms, the corresponding amounts of muscle damage in a 70-kg ewe were in average 36, 76 and 178 g, respectively. Large interindividual variations were observed between ewes for each volume injected (figure 2).

Plasma PBZ pharmacokinetics

Plasma profiles following IV and IM PBZ administration are shown in figure 3. Following IV administration, AUC of PBZ and OPBZ were $117,614 \pm 22,654$ and $4,762\pm856,95$ $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{L}$, respectively. The AUC of OPBZ representing less than 5.0% of the calculated PBZ AUC, it was considered negligible. The plasma clearance for PBZ after IV administration was 0.071 ± 0.0156 $\text{mL}/\text{kg}/\text{min}$, ie 4.2 ± 0.94 $\text{mL}/\text{kg}/\text{h}$. The maximal PBZ concentrations after 2, 4 and 8 mL IM administrations were respectively 42 ± 3.4 , 74 ± 8.8 and 119 ± 18.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and were observed at 142, 100 and 344 min (harmonic mean) after IM administration. The bioavailability of PBZ after

2, 4 and 8 mL IM administrations was not significantly different between the 3 volumes, at respectively $100 \pm 31.9 \%$, $96 \pm 18.6 \%$ and $100 \pm 17.4 \%$.

Terminal half-life for IV and IM administrations of 2, 4 and 8 mL were respectively 20.0, 16.3, 18.0 and 19.5 h.

Discussion

The sheep was selected in the present study for different reasons: i) many IM formulations are available for this food animal species, ii) the CK pharmacokinetic approach for assessment of post-injection muscle damage has been validated in sheep (Ferre, Concordet et al. 2001), and finally iii) sheep may represent a useful animal model for testing drug tolerance. Sheep are indeed convenient for handling, blood volume is not a limited factor for pharmacokinetic studies, and the basal CK activity is stable (Houpert, Serthelon et al. 1995), compared with pigs (Steiness, Rasmussen et al. 1978) and rabbits (Lefebvre, Jaeg et al. 1992). However, extrapolation of data from the ovine species to another one remains questionable as any interspecific extrapolation in terms of local tolerance testing. For example, intramuscular administration of 10% oxytetracycline formulation has been shown to be less tolerated in calves and pigs than in sheep (Nouws, Smulders et al. 1990).

The quantitative assessment of muscle damage using CK pharmacokinetic analysis has been previously proposed (Lefebvre, Toutain et al. 1994; Lefebvre, Laroute et al. 1996). The major advantages of this approach is that it is minimally invasive allowing repeated assessments in the same animal, and that it provides a quantitative estimate which is operator-independent in contrast to pathological approaches based upon scoring grids and ultrasonographic measurements. Determination of plasma and serum CK activity at arbitrarily-spaced sampling times have already been used for evaluation of post-injection muscle damage. Such a single measurement cannot be adequately interpreted or be helpful for comparing drug formulations. In contrast, repeated blood sampling over time following IM administration allows determination of the peak value of plasma CK activity and also of the AUC of plasma CK vs time. Nevertheless, such parameters do not provide any information about the amount of

CK released and the actual extent of the lesion. The only way to express an AUC into an equivalent amount of muscle damaged is to perform a kinetic approach. Using such an approach, only three parameters are necessary to measure the actual amount of CK which has been released from an injured muscle: the plasma CK clearance, the systemic availability of CK from muscle and the AUC of CK activity following the IM administration. The equivalent mass of muscle which has been totally depleted of its CK content can then be calculated from the amount of CK released and the CK muscle content (for a review, see (Lefebvre, Laroute et al. 1996)). One of the limit of the present study is that individual PK parameters have not been determined in the tested animals. The calculation of muscle damage however has been based upon an equation that we have previously validated in quite similar conditions (adulte Lacaune ewe, administration in the longissimus dorsi muscle, same CK assay).

Previous studies using CK pharmacokinetic analysis for quantitative assessment of local damage of intramuscular formulations have evaluated only the post-injection muscle damage following administration of a fixed volume of a given drug formulation. In the present study, different volumes of the test formulation were injected and the corresponding lesions were evaluated on the same animals for the first time. Over the last 10 years, this approach has been used in dogs (Aktas, Vincclair et al. 1995), horses (Volfinger, Lassourd et al. 1994; Toutain, Lassourd et al. 1995), and sheep (Houpert, Serthelon et al. 1995; Ferre, Concordet et al. 2001). For example, the equivalent amount of muscle damaged in dogs following IM administration of different drug formulations may vary from 0.04 to 0.30 g/kg body weight (Aktas, Lefebvre et al. 1995). However, accuracy of this non-invasive approach, that is the comparison of the equivalent of muscle damaged (estimated

from the CK release) with the surrogate endpoint (i.e. the true amount of muscle damage assessed by macroscopic planimetric evaluation) was only validated recently in sheep (Ferre, Concordet et al. 2001). In this study, the equivalent of muscle damaged was estimated to about 11 g following administration of 5-mL of a 20% long-acting oxytetracycline formulation in 50-kg ewes. In the same study, it was evidenced that muscle ultrasonography, another non-invasive method previously proposed to quantify post-injection muscle damage, could not be used for such an assessment.

PBZ, a non steroidal anti-inflammatory drug, is not commercially available in sheep, but was used here as a test article because of its very poor local tolerance. Interestingly, a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), like PBZ, may induce severe post-injection damage. Other NSAIDs, such as diclofenac and piroxicam in humans (Vaccarino, Sirtori et al. 1989), and diclofenac in rats (Chellman, Lollini et al. 1994), were shown also to be poorly tolerated when given by intramuscular route. The mechanisms of post-injection muscle damage of these drugs is unknown but results on both the intrinsic physicochemical properties of the test article, and also the mechanical effects of the administration on the muscle tissue. by IM route. Adverse local effects of an IM administration of PBZ has been previously documented in rat (Kienel 1973), horse (Toutain, Lassourd et al. 1995) and sheep (Houpert, Serthelon et al. 1995). In the rat, tolerance of IM PBZ administration was assessed using morphological approach after euthanasia of each animal (Kienel 1973), while in horses (Toutain, Lassourd et al. 1995) and sheep (Houpert, Serthelon et al. 1995) assessment was performed using the CK pharmacokinetic approach. In horses, it was calculated that an equivalent of 0.044 and 0.118 g/kg of muscle was destroyed after a single administration in the neck and gluteal muscles, respectively,

of the same PBZ formulation (Phenylarthrite[®]) at a dose level of 8.8 mg/kg. In the study in sheep by Houpert et al, the nominal dose of PBZ was 8 mg/kg and the concentration of the formulation was 100 mg/mL, which corresponds to a volume administered of 6 mL for a 75-kg sheep. It has been estimated using the same approach as the one we used here that the equivalent amount of muscle damaged following IM administration of PBZ was 0.037 g of muscle per kg of body weight. This amount is much lower than the averaged damaged observed in the present study. By comparison, the average damage (0.51 g/kg) following a 2-mL IM administration was about 14-fold higher in our study. This difference may result from the equation which has been used for calculation of the amount damaged from the AUC. In the equation by Houpert et al., the coefficient by which the AUC was multiplied was about 3-fold lower than the one we used. The coefficient we used was that obtained in a previous study that we have performed (Ferre, Concordet et al. 2001) in very similar conditions to those of the present study. This coefficient takes into account the CK content of the injected muscle, which depends on the anatomical site. In the study by Houpert et al. the injection site was the gluteal mass whereas the longissimus dorsi muscle was selected here. The CK muscle activity is higher in gluteal muscle (about 5,114 U/g) (Houpert, Serthelon et al. 1995) than in longissimus dorsi muscle (about 2,300 U/g) (Ferre, Concordet et al. 2001). The difference between these results may be also explained by the difference in the tested formulations. The formulation which has been used in the present study was 2-fold more concentrated and contained different excipients while the formulation used by Houpert et al contains only PBZ dissolved in sterile water. In pigs, 20 per cent-oxytetracycline formulations caused more local irritation than the 10 per cent-ones (Nouws 1984). This discrepancy in the tolerance of the same active substance shows that assessment of local tolerance of a new

formulation cannot be extrapolated from data obtained from another formulation of the same drug. Another interesting common finding between both studies is that the extent of muscle damage shows extremely large interindividual variability: the maximal amount of damaged muscle was about 9 fold higher than the minimal observed in the study by Houpert et al. These results together indicate that individual sensitivity may represent a non negligible part in the development of post-injection muscle damage.

Pharmacokinetic parameters of PBZ following IV and IM administrations have been previously published (Houpert, Serthelon et al. 1995; Cheng, McKeller et al. 1998). Following IV administrations, the average plasma clearance ranged from 4.6 (Cheng, McKeller et al. 1998) to 14.4 mL/kg/h (Houpert, Serthelon et al. 1995). The elimination half-life was about 11 (Houpert, Serthelon et al. 1995) and 18 h (Cheng, McKeller et al. 1998). Plasma clearance and elimination half-life determined in the present study are quite close to those obtained by Cheng et al.. The discrepancy with the results obtained by Houpert et al may result from differences in the composition of the formulations which have been used, but unfortunately, the complete composition of the formulations was not supplied by the manufacturers. Following IM administrations of PBZ at a dose level of 8 mg/kg, the peak concentration was 47 µg/mL and obtained about 30 minutes after administration (Houpert, Serthelon et al. 1995). This peak value is consistent with the results obtained here. The shorter C_{max} observed by Houpert et al may also result from differences between the formulations tested. The terminal half-life determined after IM administration was similar to those observed following IV administration, as previously described in another study (Houpert, Serthelon et al. 1995) indicating that there is no flip-flop process, i.e. a longer elimination half-life following IM administration due to delayed absorption.

Data for OPBZ were not analyzed as the AUC ratios of OPBZ to PBZ were very small, as already described in a previous study (Cheng, McKeller et al. 1998).

One of the major objective in the present study was to assess if the volume of formulation injected may affect muscle bioavailability because of increased muscle damage. Muscle bioavailability was reported to be absolute in sheep (Houpert, Serthelon et al. 1995), as observed here whatever the volume of PBZ formulation administered. The effect of the volume administered intramuscularly on the drug bioavailability has never been documented in sheep. Effect of the volume administered on local damage has been investigated in humans (Sidell, Culver et al. 1974) and animals (Newton, Cusik et al. 1975; Nouws 1984; Diness 1985) for different pharmaceutical compounds. For example, tissue damage was proportional to injection volumes between 0.25 and 1 mL in rabbits, and 0.5 and 3 mL in pigs (Diness 1985). There are very few studies investigating the influence of local tissue irritation on the pharmacokinetics of the drug, and especially its bioavailability from the injection site. An inverse relationship between the extent of muscle damage and the drug bioavailability could be hypothesized from previous studies (Nouws 1984; Luthman, Dall et al. 1988). The most tissue irritating products were shown to give lower maximum levels in serum, as shown in pigs for penicillin G preparations (Luthman, Dall et al. 1988). The oxytetracycline residues in pigs increased with the extent of tissue damage at the injection site (Nouws 1984). In these studies, increased tissue damage was, in fact, induced by increasing concentration of the formulation or because of irritating excipients, but not by changing the volume itself. It is however recommended to avoid administration of a large volume at the same injection site but to perform two administrations at two different sites with half the volume. It could be also assumed that because IM administration of increased

volume of the same formulation increased post-injection muscle damage, it may also alter drug bioavailability. In ruminant calves, the bioavailability of an oxytetracycline formulation was slightly lower (by about 15%) at injection site with local severe irritation (Nouws and Vree 1983). In contrast, IM administration of diazepam dissolved in three different cosolvents that caused a 10-fold difference in the degree of local muscle damage did not seem to affect the drug bioavailability in rabbits (Brazeau and Fung 1990). Our results confirm these previous findings. The local muscle damage, but not the bioavailability, depends on the volume injected of the tested PBZ formulation. Moreover, the corresponding amount of muscle damage, although showing large interindividual variabilities, tends to be relatively proportional to the volume injected, indicating consequently that injecting half volume to two different sites would finally induce a similar amount of muscle damage than the full volume administered at a unique site. Further investigations are however required to assess this issue more adequately. The results cannot be extrapolated to other drug formulations, but this study demonstrate that the non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of CK release may offer new alternatives to pharmaceutical companies for documenting formulation-dependent factors, such as here the volume, on local tolerance with a minimally invasive approach at initial steps of drug development.

Table 1 – Area under the plasma creatine kinase (CK) activity vs time curve (AUC, U.min/L), observed peak plasma CK activity (Cmax, U/L) and observed time to peak plasma CK activity (Tmax, min) after a single intramuscular administration of 2, 4 and 8 mL of a 20 % phenylbutazone formulation in six ewes

		Volume of intramuscular phenylbutazone		
Variable		2 mL	4 mL	8 mL
AUC	Mean	816	1731	4056
	SD	851	1426	4842
Cmax	Mean	533	1254	2693
	SD	596	683	2094
Tmax	Mean	592	244	523
	SD	160	130	459

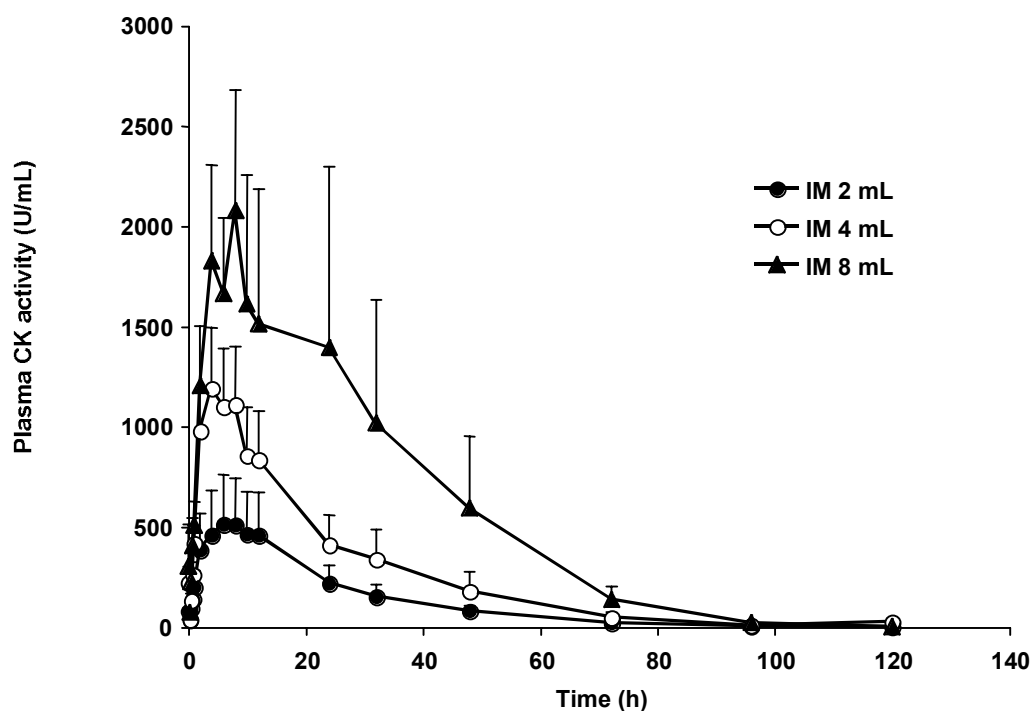


Figure 1 – Mean plasma profiles of plasma CK activity vs time (\pm sem) after a single intramuscular administration of 2 , 4 and 8 mL of a 20 % phenylbutazone formulation in six ewes.

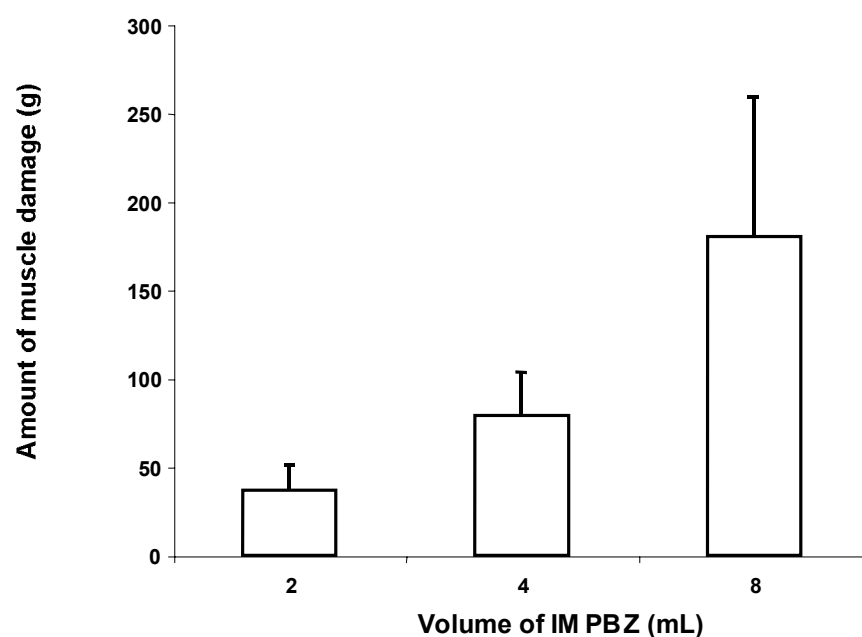


Figure 2 – Mean amount of muscle damage (\pm sd) after intramuscular administration of 2, 4 and 8 mL of a 20 % phenylbutazone formulation in six ewes

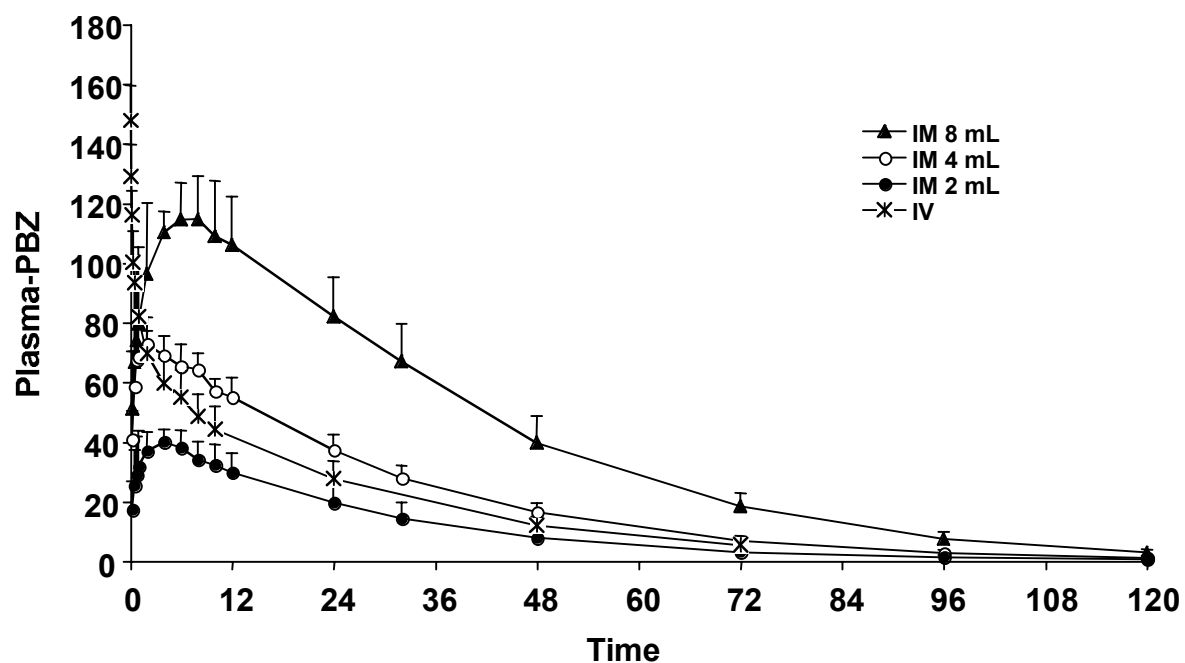


Figure 3 – Mean plasma profiles (\pm sd) of phenylbutazone concentration vs time after a single intramuscular administration of 2, 4 and 8 mL, i.e. respectively 5.2, 10.5 and 21.3 mg/kg of a 20 % phenylbutazone formulation in six ewes, and after intravenous bolus administration of phenylbutazone at a dose level of 8,0 mg/kg. .

References

- Aktas, M., H. P. Lefebvre, et al. (1995). "Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates." J Vet Pharmacol Ther **18**(1): 1-6.
- Aktas, M., P. Vincclair, et al. (1995). "In vivo quantification of muscle damage in dogs after intramuscular administration of drugs." Br Vet J **151**(2): 189-96.
- Behrens, H., G. Matschullat, et al. (1975). "Über die Verträglichkeit öligler Vitaminlösungen beim Schaf nach intramuskulärer Applikation." Dtsch Tierärztl Wschr(82): 27-31.
- Brazeau, G. A. and H. L. Fung (1990). "Effect of organic cosolvent-induced skeletal muscle damage on the bioavailability of intramuscular [¹⁴C]diazepam." J Pharm Sci **79**(9): 773-7.
- Chellman, G. J., L. O. Lollini, et al. (1994). "Comparison of ketorolac tromethamine with other injectable nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain-on-injection and muscle damage in the rat." Hum Exp Toxicol **13**: 111-117.
- Cheng, Z., Q. McKeller, et al. (1998). "Pharmacokinetic studies of flunixin meglumine and phenylbutazone in plasma, exudate and transudate in sheep." J Vet Pharmacol Ther **21**(4): 315-21.
- Dagorn, M., P. Guillot, et al. (1990). "Pharmacokinetics of chloramphenicol in sheep after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration." Vet Q **12**(3): 166-74.
- Dexter, D. R., G. L. Cowman, et al. (1994). "Incidence of injection-site blemishes in beef top sirloin butts." J Anim Sci **72**(4): 824-7.
- Dickson, J., D. L. Hopkins, et al. (1986). "Muscle damage associated with injections of vitamin E in sheep." Aust Vet J **63**(7): 231-3.
- Diness, V. (1985). "Local tissue damage after intramuscular injections in rabbits and pigs: quantification by determination of creatine kinase activity at injection sites." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **56**: 410-415.
- Ferre, P. J., D. Concordet, et al. (2001). "Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative

- assessment of postinjection muscle damage in sheep." Am J Vet Res **62**(11): 1698-705.
- Houpert, P., J. P. Serthelon, et al. (1995). "In vivo non-invasive quantification of muscle damage following a single intramuscular injection of phenylbutazone in sheep." Vet Hum Toxicol **37**(2): 105-10.
- Kienel, G. (1973). "Eine rationelle Methode zur tierexperimentellen Prüfung der lokalen Verträglichkeit von intramuskulären Injektionen." Arzneim Forsch **23**: 263-266.
- Lefebvre, H. P., J. P. Jaeg, et al. (1992). "Variations of plasma creatine kinase in rabbits following repetitive blood sampling effects of pretreatment with acepromazine, carazolol and dantrolene." Eur J Clin Chem Clin Biochem **30**(7): 425-8.
- Lefebvre, H. P., V. Laroute, et al. (1996). "Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release." Vet Res **27**(4-5): 343-61.
- Lefebvre, H. P., P. L. Toutain, et al. (1994). "Pharmacokinetic variables and bioavailability from muscle of creatine kinase in cattle." Am J Vet Res **55**(4): 487-93.
- Luthman, J., V. Dall, et al. (1988). "Influence of the local tolerance on the pharmacokinetics of two penicillin G preparations in cattle and swine." Acta Vet Scand **29**: 199-206.
- Mitema, E. S. (1985). "Comparative studies of the effects of quinuronium sulfate and diminazene diaceturate in sheep." Vet Hum Toxicol **27**(6): 539-42.
- Newton, W. M., P. K. Cusik, et al. (1975). "Innovar-vet induced pathologic changes in the guinea pig." Lab Anim Sci **25**: 597-601.
- Nouws, J. F. (1984). "Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs." Vet Q **6**(2): 80-4.
- Nouws, J. F., A. Smulders, et al. (1990). "A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep." Vet Q **12**(3): 129-38.

- Nouws, J. F. and T. B. Vree (1983). "Effect of injection site on the bioavailability of an oxytetracycline formulation in ruminant calves." Vet Q **5**(4): 165-70.
- Oshida, S., K. Degawa, et al. (1979). "Physico-chemical properties and local toxic effects of injectables." Tohoku J Exp Med **127**(4): 301-16.
- Roeber, D. L., R. C. Cannell, et al. (2001). "Incidence of injection-site lesions in beef top sirloin butts." J Anim Sci **79**(10): 2615-8.
- Sidell, F. R., D. L. Culver, et al. (1974). "Serum creatine phosphokinase activity after intramuscular injection. The effect of dose, concentration, and volume." Jama **229**(14): 1894-7.
- Steiness, E., F. Rasmussen, et al. (1978). "A comparative study of serum creatine phosphokinase (CPK) activity in rabbits, pigs and humans after intramuscular injection of local damaging drugs." Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) **42**(5): 357-64.
- Toutain, P. L., V. Lassourd, et al. (1995). "A non-invasive and quantitative method for the study of tissue injury caused by intramuscular injection of drugs in horses." J Vet Pharmacol Ther **18**(3): 226-35.
- Vaccarino, V., C. R. Sirtori, et al. (1989). "Local and systemic tolerability of piroxicam after intramuscular administration in healthy volunteers." Curr Therap Res **45**(1): 1-13.
- Volfinger, L., V. Lassourd, et al. (1994). "Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released." Am J Physiol **266**: R434-R441.

C. Discussion générale

La méthode utilisée comme technique de routine pour évaluer les lésions musculaires d'origine iatrogène est l'examen anatomopathologique. Nous avons vu que cet examen consiste souvent au classement des lésions par rapport à une grille pré-établie. Les comparaisons sont difficiles puisque les résultats sont au mieux semi-quantitatifs. Dans le modèle que nous avons utilisé chez la brebis, les résultats des examens macroscopiques qualitatifs étaient en agrément total pour 53 % seulement des tranches musculaires examinées. Lors des mesures quantitatives par 3 opérateurs, les coefficients de répétabilité et de reproductibilité (48 et 34 %) ont confirmé que l'examen anatomopathologique n'est pas une méthode optimale pour l'évaluation quantitative pour les lésions musculaires iatrogènes.

1. Echographie

Nos résultats montrent que l'échographie est une méthode de mesure fiable pour la mesure des distances anatomiques. Ainsi, les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité obtenus lors de la mesure des dimensions du muscle intact chez la brebis étaient inférieurs à 15 %. Ces résultats sont en accord avec les coefficients de variation inférieurs à 16,5 % décrits par exemple pour la mesure des organes urinaires (Braun, 1993, 1991) ou de la région ventrale de l'encolure (Braun *et al.*, 1994) chez les bovins. Chez le cheval, des mesures de la structure du bassin par échographie ont été également très fortement corrélées aux mesures réalisées par résonance magnétique (Tomlinson *et al.*, 2001). De manière simplifiée, le principe de l'échographie est basé sur l'émission d'ultrasons et leur réflexion secondaire lorsqu'ils traversent un tissu d'impédance différente. Ainsi, une onde est renvoyée à l'appareil lorsque le faisceau traverse une frontière entre deux tissus. L'aptitude de l'échographie à bien mettre en évidence les limites des organes et des muscles plus particulièrement est liée à leurs interfaces (enveloppes, fascias...) qui sont très échogènes.

Malgré ses bonnes qualités métrologiques intrinsèques, l'échographie n'est pas une technique suffisamment sensible et fiable pour la détection et la mesure des lésions musculaires iatrogènes. Ainsi, alors que tous les muscles examinés par échographie chez la brebis présentaient des lésions de type aigu ou plus chronique, les lésions ont été détectées sur seulement 60 % des clichés. De plus, les surfaces moyennes

mesurées par échographie étaient 2,5 à 5,3 fois inférieures aux surfaces mesurées par analyse d'images après abattage et découpe des animaux, ce qui souligne l'inexactitude de la méthode. Enfin, les coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité (61,4 et 101,4 % respectivement) entre les 3 opérateurs ont été très supérieurs aux limites communément admises en biologie. A l'inverse d'un muscle aux limites bien définies par des fascias, les contours d'une lésion musculaire ne sont certainement pas assez marqués pour permettre un renvoi important des ondes vers l'appareil et une délimitation nette des lésions. Ce défaut de netteté des contours lésionnels a conduit à des difficultés dans le suivi quotidien de la détection et de l'évolution des lésions.

L'échographie, malgré ses qualités pratiques *a priori* (Kles *et al.*, 1997), n'est pas une technique utilisable pour la détection, ni pour l'évaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes en l'état actuel de la technologie des systèmes proposés. Même des techniques d'imagerie médicale plus précises, comme l'imagerie par résonance magnétique, sont difficilement utilisables dans l'évaluation des lésions iatrogènes. En effet, une autre étude a mis en évidence des difficultés dans la délimitation des lésions musculaires iatrogènes chez l'homme, de manière comparable à l'échographie utilisée dans notre étude (Nosaka et Sakamoto, 1999), malgré le fait que la précision de mesure semble excellente en comparaison avec la mesure d'images photographiques de pièces anatomiques (Beneke *et al.*, 1991).

2. Analyse pharmacocinétique de la CK

L'analyse pharmacocinétique de la CK plasmatique pour l'évaluation quantitative des lésions musculaires a été développée précédemment avec une description des principaux facteurs de variation analytiques ou pré-analytiques ainsi qu'une évaluation de ses paramètres pharmacocinétiques chez plusieurs espèces (Lefebvre HP, 1994; Lefebvre H. P. *et al.*, 1996). Cette approche a été utilisée pour évaluer ou pour comparer la tolérance locale de formulations injectables chez plusieurs espèces, mais n'avait pas été validée par rapport à la quantification directe des lésions musculaires (Aktas *et al.*, 1995b; Lassourd, 1995; Oukessou *et al.*, 1992; Pyorala *et al.*, 1999; Toutain *et al.*, 1995). Nos résultats démontrent en outre que cette méthode est utilisable comme technique de routine puisque les résultats sont en corrélation et en agrément avec la taille des lésions musculaires mesurées par

analyse macroscopique directe sur les mêmes animaux. Dans notre étude, le calcul des paramètres d'élimination (clairance) et de biodisponibilité (F) de la CK pour chaque brebis par injection IM et IV d'homogénat musculaire homologue ont permis d'individualiser les estimations des quantités de muscle détruit par chaque administration. Cette étape n'est pas nécessaire lorsque l'on souhaite comparer plusieurs formulations chez les mêmes animaux, il est alors possible d'utiliser les coefficients généraux décrits dans la partie bibliographique si l'on veut exprimer la quantité de muscle détruit en équivalent de masse musculaire atteinte.

La méthode de calcul des AUC par analyse non-compartimentale repose sur la construction de trapèzes arithmétiques entre les points de dosage (Gibaldi et Perrier, 1982). Cette méthode est simple à mettre en œuvre et ne dépend pas de l'opérateur, en comparaison avec l'analyse compartimentale qui repose sur le choix d'un modèle et l'optimisation mathématique de ses paramètres. De plus, les résultats obtenus par analyse pharmacocinétique non-compartimentale sont comparables aux résultats obtenus par modélisation pharmacocinétique suivie de déconvolution à partir des concentrations d'activité CK observées.

L'application de la méthode que nous avons menée avec 3 volumes croissants de phénylbutazone chez la brebis a montré que l'augmentation de l'étendue lésionnelle n'avait pas d'influence sur la biodisponibilité du principe actif.

3. Hypothèses physiopathologiques

La technique de déconvolution a permis d'estimer le débit d'entrée de la CK depuis le muscle vers la circulation générale, ce qui donne des informations sur la cinétique de la souffrance des myocytes. Le premier pic de débit, observé très précocement après l'injection, a pu être mis en relation avec la destruction mécanique brutale des cellules musculaires et endothéliales, suivie d'un passage direct et massif de composants cellulaires, dont la CK, dans la circulation sanguine. En effet, la CK libérée par le muscle atteint normalement la circulation générale par voie lymphatique lorsqu'il n'y a pas de lésion musculaire majeure (Hsu et Watanabe, 1983). Le deuxième pic, observé environ 6 h après l'administration IM pourrait correspondre au temps de transit lymphatique d'une partie de la CK qui a été libérée brutalement au moment de l'injection. Un troisième pic de débit, plus tardif,

d'intensité moins importante mais de durée plus longue peut signer les dommages tardifs subis par le muscle à bas bruit.

Lors de l'administration d'oxytétracycline chez la brebis, l'observation de variations de la température cutanée après l'administration nous a permis de dégager des hypothèses de travail sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu. En effet, l'hypothermie transitoire au site d'injection pouvait traduire une vasoconstriction locale importante conduisant à une ischémie tissulaire juste après l'administration. L'hyperthermie observée ensuite pouvait refléter une inflammation du tissu (d'ailleurs visible lors de l'examen macroscopique ou microscopique des sites d'injection), ou une vasodilatation réactionnelle (avec un syndrome d'ischémie-reperfusion associé aux deux phases).

II. Mécanismes physiopathologiques du développement des lésions musculaires d'origine iatrogène

Modèle expérimental

Dans presque toutes les études suivantes, à vocation mécanistique, les lésions musculaires ont été induites de manière similaire par une solution de propylène glycol (PG, 1,2-Propanediol, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France). Le PG est un excipient organique dont la myotoxicité a été décrite antérieurement (Brazeau et Fung, 1990, 1989). Les principes actifs développés par l'industrie pharmaceutique étant de moins en moins solubles dans les milieux aqueux, le PG est un excipient qui est utilisé de plus en plus dans les formulations médicamenteuses (Mottu *et al.*, 2000).

Les études mécanistiques ont été menées en utilisant différentes espèces animales (rat, lapin, porc), afin de disposer pour chaque étape des outils méthodologiques et des réactifs nécessaires.

A. Etude de l'inflammation musculaire : Voie des cyclooxygénases

1. Etude 1 - Mise en évidence des COX dans le muscle strié squelettique (Article 3)

Problématique : Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, les COX n'ont jamais été mises en évidence dans le muscle strié squelettique. Or, après une administration IM, les lésions constatées sont de type inflammatoire, avec donc vraisemblablement une participation des COX.

Objectif : Décrire précisément les profils d'expression des COX-1 et COX-2 (ARN et protéines) après l'induction d'une lésion musculaire, en phase aiguë. Cette étude a été menée chez le rat, modèle animal pour lequel les réactifs utilisés en biologie moléculaire sont disponibles.

Matériels et méthodes : Le muscle *Gastrocnemius* a été soumis à une ischémie-reperfusion expérimentale par la méthode du tourniquet, qui a consisté à appliquer un garrot à la base d'un membre postérieur (Strock et Majno, 1969). L'ischémie, modérée, était fixée à 2 h, mais les temps de reperfusion étaient variables : 0, 1, 2, 4, 6, 10, 24 et 72 h. Techniquement, l'ischémie-reperfusion est plus adaptée à la biologie moléculaire que la lésion au point d'injection. Au contraire d'une lésion au point d'injection, focale, l'ischémie-reperfusion du muscle *Gastrocnemius* par la technique du tourniquet a été choisie comme modèle afin de garantir une homogénéité de la lésion au sein du muscle tout entier. Ceci a permis l'utilisation d'un volume suffisant de matériel tissulaire, nécessaire pour la réalisation des phases de biologie moléculaire. De plus, le modèle d'ischémie-reperfusion présentait une analogie avec notre hypothèse de travail (cf évolution de la température cutanée du site d'injection chez le mouton, article 1).

La lésion musculaire a été évaluée de 3 façons : analyse histologique des muscles, pesée du muscle et de son témoin controlatéral (index de mesure de l'œdème), et dosage de la concentration d'activité CK plasmatique.

Les ARNm pour COX-1 et COX-2 ont été mis en évidence par RT-PCR semi-quantitative, les protéines COX-1 et COX-2 par western-blot.

Résultats : L'œdème musculaire était maximal à 10 h de reperfusion, tandis que l'activité plasmatique de la CK était en moyenne fortement augmentée dès la fin de l'ischémie jusqu'à 24 h de reperfusion, avec un retour aux valeurs basales usuelles à 72 h de reperfusion.

Une surexpression tardive des ARNm COX-1 était détectable à 24 et 72 h de reperfusion, alors que les protéines COX-1 étaient exprimées à un niveau comparable dans le muscle soumis à l'ischémie et son homologue controlatéral.

Les ARNm COX-2 étaient très faiblement détectables dans les muscles témoins, à un niveau proche du bruit de fond. Dans les muscles soumis à l'ischémie-reperfusion, une expression faible a été détectée chez 3 des 5 rats aux temps 1, 10 et 72 h de reperfusion. Les protéines COX-2 n'étaient pas détectables dans le muscle témoin, mais très nettement présentes dans les muscles à 6, 10 et 24 h de reperfusion, de manière maximale à 10 h.

Article 3 :

Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle

Dupouy V, Ferre P, Uro-Coste E, Lefebvre HP

Journal of Applied Physiology, en cours d'acceptation

Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle

DUPOUY V.¹, FERRE P.J.¹, URO-COSTE E², LEFEBVRE H.P.¹

1 UMR 181 Experimental Pathophysiology and Toxicology INRA/ENVT, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31 076 Toulouse cedex 03, France

2 Department of Pathology, CHU Rangueil, avenue Professeur Jean Poulhes, 31 403 Toulouse cedex 04, France

Running head : COXs and skeletal muscle after ischemia-reperfusion

Contact information : V. Dupouy, UMR 181 Experimental Pathophysiology and Toxicology INRA/ENVT, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31 076 Toulouse cedex 03, France. E-mail address : v.dupouy@envt.fr

Abstract

The aim of this study was to assess COX-1 and COX-2 expression in skeletal muscle after ischemia/reperfusion (IR).

Male Sprague-Dawley rats were subjected to unilateral hindlimb ischemia for 2 h and then euthanized after 0, 1, 2, 4, 6, 10, 24 and 72 hours of reperfusion. The COX protein and mRNA were assessed in control and injured gastrocnemius muscle. Muscle damage was indirectly determined by plasma creatine kinase activity (CK) and edema by weighing of the wet muscle.

CK activity in plasma increased as early as 1 hour after reperfusion and returned to control levels by 72 h reperfusion. Foci of necrotic cells were visualized after 10 h of reperfusion. Edema was observed at 6 and 10 h of reperfusion but no inflammatory cells infiltration.

COX-1 mRNA remained increased at 24 and 72 h reperfusion, but COX-1 protein was detected at similar levels in control and injured gastrocnemius muscle. COX-2 mRNA was not or only slightly detectable in control and after IR. In contrast, IR induced major over-expression of COX-2 immunoreactivity at 6 and 10 h of reperfusion with a maximum at 10 h whereas COX-2 protein was undetectable in control muscle.

In conclusion, hindlimb IR induced a large over-expression of COX-2 protein, but not COX-1, between 6 and 10 h after injury. These results suggest a role for COX-2 in such pathophysiological conditions of skeletal muscle.

Key words : cyclooxygenase, skeletal muscle injury, ischemia-reperfusion, inflammation.

INTRODUCTION

The cyclooxygenase (COX) isoforms, COX-1 and COX-2, catalyze the initial step in the metabolism of arachidonic acid to the intermediate prostaglandin H₂(PGH₂) which is converted to the various prostaglandins and thromboxanes by cell specific enzymes. COX-1 is often constitutively present, and COX-2 is not expressed or at very low levels in most normal tissues, but may be rapidly upregulated in pathological conditions such as inflammation. These differences may be relevant not only in understanding the inflammatory response following tissue injury, but also the efficacy and safety aspects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs (NSAIDs). The expression of COX isoforms differs according to physiological and pathological conditions. For example, under physiological conditions in rats, COX-1 mRNA is expressed in the liver, kidney, and lung, but not in the heart, whereas COX-2 mRNA is expressed in the kidney, heart, and lung, but not in the liver (30). Ischemia/reperfusion (IR) is a common pathophysiological process and IR-induced changes in COX-1/COX-2 expression have been reported in various organs and tissues, such as brain (32), stomach (26), myocardium (35), kidney (37) and more recently retina (23).

In contrast, COX isoforms have been poorly documented in skeletal muscle. Acute ischemia followed by reperfusion provides a relevant model of musculoskeletal pathology as it is a common complication of trauma, hemorrhage, vascular stenosis and thromboembolic events. Although surgical treatment generally allows rapid recovery of skeletal muscle, the restoration of blood flow following ischemia may also induce severe injury characterized by edema, muscle cell lesions, alteration of local blood flow and loss of muscle function. However, no study to our knowledge has investigated the basal levels of COX-1 and COX-2 mRNA and protein in healthy and IR conditions, despite the fact that the COX system may be a relevant candidate for implication in pathophysiology of IR in skeletal muscle. Indeed, dexamethasone decreases *in vitro* COX activity in skeletal muscle (7) and improves the survival of ischemic-reperfused muscle (27) likely from a combination of activities, such as the inhibition of the production of inflammatory mediators.

In the present study, we addressed the question of whether COX expression is constitutive and/or related to pathophysiology of skeletal muscle IR. We assessed the

expression of COX-1 and COX-2 mRNA and proteins in skeletal muscle under normal conditions and following ischemia/reperfusion in rats.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Forty Sprague-Dawley male rats (Harlan France, Gannat, France), weighing 262-316 g, were divided into 8 groups of 5 rats. They were housed in plastic cages and allowed free access to standard pellet chow and water. All experiments were performed according to the Guide For Care and Use of Laboratory Animals (34).

Ischemia/reperfusion model and sampling

The model selected in the present study was the rat hindlimb tourniquet ischemia model (38). Briefly, rats were anesthetized (chloralose 0.2 g/kg and urethane 2 g/kg, i.p.), the left hind limb was shaved and a size-13 mm rubber band was placed around the thigh as high up as possible. Ischemia was maintained for 2 hours followed by various times of reperfusion until euthanasia of the animals by groups, after 0, 1, 2, 4, 6, 10, 24 or 72 hours. At the end of the reperfusion period, blood was sampled from the abdominal aorta and the rats were euthanized by intra-cardiac pentobarbital injection. For times 4, 6, 10, 24 and 72 hours post-reperfusion, isoflurane anesthesia was performed just before euthanasia to allow blood sampling. Left (injured) and right (control) gastrocnemius muscles were then harvested. Immediately after weighing, standardized transversal section of superficial and deep gastrocnemius muscles were performed by a trained operator.

Assessment of muscle edema and damage

The IR and contralateral control gastrocnemius muscles were weighed. The relative increase (%) in injured muscle weight versus contralateral was calculated. Muscle damage was assessed by plasma creatine kinase (CK). CK activity was assessed in plasma according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry (20). Briefly, an enzymatic kit was used (Enzyline CK NAC optimisé unitaire, BioMérieux, Craponne, France). The activity of CK was determined from the increase in absorbance (340 nm) corresponding to the NADP reduction measured at 1 min intervals for 5 minutes with an automated reader (μ Quant Biomolecular

Spectrophotometer, Bio-Tek Instruments, INC, Winooski, USA). The level of quantification was 10 U/L.

For the histological examination, an aliquot of the muscle was fixed in 4% paraformaldehyde in Phosphate Buffered Saline, dehydrated and embedded in paraffin. 5 µm sections were counterstained with hematoxylin and eosine. Microscopic examinations were performed by an experienced pathologist.

Western Blot

One aliquot of the gastrocnemius muscle was immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C until used. The muscle sample was homogenized in extraction buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5, D-mannitol 250 mM, EDTA 3 mM, diethyl dithiocarbonate 1 mM, benzamidine 1 mM, soybean trypsin inhibitor (10 µg/mL), deoxychoilic acid (24 mM), tergitol (5 g/L), and sonicated. After removal of cellular debris by centrifugation (10,000 g for 10 minutes at 4°C), nuclear and microsomal fractions were obtained by centrifugation at 100,000 g for 1 h at 4°C. The pellet was diluted in extraction buffer 0.25% SDS. Protein concentration was assessed with a commercial assay (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, France). For immunoblotting, 100 µg microsomal protein were loaded per gel lane, separated in a 10% SDS-polyacrylamide gel and then transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) in transfer buffer. Molecular weight markers and a positive control tissue for COX staining (rat placenta microsomal fraction) were loaded on each gel. The blot was initially blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in PBS containing 0.1% tween 20 (PBS-0.1%T-5%M), and then incubated overnight with a rabbit anti-murine affinity purified antibody COX-1 1/500 or COX-2 1/1000 diluted in PBS-0.1%T-5%M (Cayman Chemical, Spi-Bio, Massy, France). After thoroughly washing the nitrocellulose membrane with PBS-0.1%T, the antibody-protein complexes were blotted for 1 h at room temperature with secondary antibody, a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG 1/500 (Amersham Biosciences, Orsay, France). Blots were developed using the ECL-Plus chemoluminescent reagent (Amersham Sciences, Orsay, France) and subjected to autoradiography (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). The band density were determined with Image Quant Software Bio-1D V99 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France). For a given animal, the IR muscle and contralateral control muscle were loaded side by side on the same gel to control for

differences in antibody binding and blocking (COX-1 or COX-2 blocking peptide, Cayman Chemical, Spi-Bio, Massy, France).

Semi-quantitative RT-PCR

COX mRNA expression was assessed by semi-quantitative RT-PCR analysis. After sampling, part of the muscle was immediately placed in an RNA stabilization solution (RNAlater, CliniSciences, Montrouge, France) overnight at 4°C, and then stored at – 80°C until RNA extraction.

Total RNA was extracted using a thiocyanic-acid-guanidine method (6), treated with RNase- free DNase I to remove potential DNA contamination (RocheDiagnostics, Meylan, France) and re-suspended in RNase-free sterile water. RNA integrity and yield were assessed by UV-spectrophotometry and ethidium bromide staining.

Single strand cDNAs were synthesized from total RNA using oligodT priming with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen life technologies, Pontoise, France). 0.5 µCi of $\alpha^{32}\text{P}$ labeled dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) was added to monitor the transcription. For each sample, reaction without transcriptase was run as a control for DNA contamination. After one hour incubation, the RNA was hydrolyzed, cDNA was purified by G50 chromatography and quantified by measuring the radioactivity incorporated. cDNA was further precipitated with ethanol-NaCl and resuspended in sterile water to reach a concentration of 1 ng cDNA/µL.

PCR reactions were performed in a total volume of 25 µL. 5 µL of diluted cDNA (i.e. 100, 50 and 25 pg/µL) were amplified in a 20 µL PCR mixture containing 2.5 µL 10X PCR buffer, 2.5 µL dNTP cocktail 2 mM, 2.5 µl MgCl_2 15 mM, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Diagnostics, Pontoise, France), and 1 µM final concentration of both sense and antisense primers. Negative (water replacing cDNA in PCR reaction) and positive control (cDNA from muscle with detectable COX-2 mRNA in PCR reaction) were included to each PCR run.

Primer selection was based on previously published rat COX-1 (14), COX-2 (24) and glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH) (40) sequences in the GenBank database. A 435 pb COX-1 fragment was amplified using the following primers : sense, 5'-GCC GGA TTG GTG GGG GTA G-3' and antisense, 5'-AGG GGC AGG TCT TGG TGT TG-3'. A 282 pb COX-2 fragment was amplified using the following primers : sense, 5'-CTG TAT CCC GCC GCC CTG CTG GTG-3' and antisense, 5'-ACT TGC GTT GAT GGT GGC TGT CT-3'. A 388 pb GAPDH fragment

was amplified using the following primers : sense, 5'-TCA TCA TCT CCG CCC CTT C-3' and antisense, 5'-CGG CAT GTC GTC AGA TCC ACA AC-3'. The PCR amplification was performed on a MJ Research PTC 200 thermocycler (MJ Research, Alameda, USA) as follows : Initial denaturation at 94°C for 5 minutes followed by 19-34 cycles of amplification (1 min at 94 °C, 30 s at the specific hybridisation temperature of each primer pair, 1 min at 72 °C). We performed for GAPDH 19 PCR cycles with an annealing temperature at 60°C, for COX-1 31 cycles at 64°C and for COX-2 34 cycles at 70°C. The number of cycles was selected so as to fall within the exponential phase of the amplification reaction for the cDNA dilution assessed. PCR reaction products were resolved by electrophoresis through a 1% agarose gel. The amplified DNA fragments were detected by ethidium bromide staining and the band density determined with Image Quant Software Bio-1D V99 (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France). The COX values were normalized against GAPDH values for analysis.

Statistics

Plasma CK activity, muscle weight, COX isoforms proteins and COX-1 mRNA data are presented here as means \pm SD. Statistical analysis was performed after Log-transformation to homogenize variance when appropriate (plasma CK activity, COX-2 protein). Data were then subjected to an analysis of variance, significant differences were assessed by Dunnett's test with $p < 0.05$ for comparison with the control value (2 hours ischemia and no reperfusion). A pairwise comparison between groups allowing statistical significance to be shown with the control value were assessed by Tukey's test (SYSTAT Version 10, SPSS Inc., Chicago, USA).

RESULTS

Pathological findings

Two hours of hindlimb ischemia/reperfusion induced edema with a maximum value observed after 10 hours of reperfusion (muscle weight increased by 25.6 ± 9.8 % vs control) (Fig. 1).

Plasma CK activity was 608 ± 413 UI/L after 2 hours ischemia without reperfusion, then increased to remain at a plateau from 1 to 24 hours of reperfusion (maximum

value : 3530 ± 3240 U/L) and returned to control level by 72 hours of reperfusion (77 ± 15 U/L) (Fig. 2).

Microscopic examination of the gastrocnemius muscle showed foci of necrotic muscle cells in two out of five rats at 10 hours after reperfusion (data not shown).

COX protein and mRNA in skeletal muscle

Expression of COX-1 mRNA was observed in the control and IR muscles with consistent over-expression after 24 and 72 hours of reperfusion (Fig. 3).

The expression of COX-2 mRNA was undetectable or only faintly detectable in control muscle and after IR. At 1, 10 and 72 hours of reperfusion, a mild signal, hardly to distinguish from background level, was observed in only 3 animals per group. Thus, no modification of COX-2 mRNA expression could be evidenced after IR.

COX-1 immunoreactivity at 70 KDa was revealed in gastrocnemius muscle under basal conditions and no detectable changes occurred after ischemia of the hindlimb and 0 to 72 hours of reperfusion (Fig. 3).

COX-2 immunoreactivity was undetectable in control muscle. Ischemia for 2 hours followed by 6 or 10 hours of reperfusion triggered a major over-expression of COX-2 67 KDa protein with maximal level at 10 hours. COX-2 protein was undetectable at 0, 1, 2, 4 and 72 hours at 24 hours reperfusion (Fig 4).

DISCUSSION

This study is the first to assess the COX-1 and COX-2 mRNA and protein in skeletal muscle, in control and IR conditions. Skeletal muscle necrosis following IR injury is a major issue in plastic and reconstructive surgery (25) and is a significant cause of morbidity after traumatic injury (2). The tourniquet hind-limb model is generally considered to appropriately mimic these clinical situations. The level of irreversible muscle damage is related to the duration of ischemia but not to reperfusion. In a preliminary experiment (data not shown), we showed that a 4- hour period of ischemia induced high mortality and morbidity in rats and prevented experiments up to 3 days after the end of ischemia. A follow-up of 3 days is indeed required to accurately document the time development of the inflammation process, and the potential concomitant changes in COX-1/COX-2 expression. A two hour period of

ischemia induced damage that was reversible and allowed adequate investigation, as shown previously in other studies of IR injury and potential therapeutic strategies (27, 47).

In our study this two hour ischemia induced a mild inflammatory response and muscle damage as evidenced by edema and increased plasma CK activity. Edema, assessed indirectly from the muscle weight, was maximal after 10 hours reperfusion. CK plasma activity is considered as the best marker of muscle damage (29). A dramatic increase in plasma CK activity was observed after as little as 1 hour reperfusion (3 fold versus no reperfusion) and then remained to a plateau through 24 hours reperfusion (6 fold versus no reperfusion). This CK response pattern is likely due to an immediate CK release from muscle cells adjacent to the vascular system, and then to arrival in the systemic circulation of the bulk CK by the lymph. Microscopic examination of injured muscle revealed limited changes in some rats (foci of necrotic muscle cells) after 10 h reperfusion. However the increase in plasma CK activity after 1 hour reperfusion indicated a profound alteration of cell permeability early in the time course of the lesion. Furthermore, no leukocyte infiltration was observed by microscopic examination although edema was evidenced indicating the development of inflammation. Other results, based on comparable models, suggest that at least 5-24 h is required before any infiltration can be detected histologically (33, 36). In our study, the occurrence of muscle damage and edema is in agreement with other reports on similar models, while the presence or absence of leukocyte infiltrations differ greatly according to authors (9, 19).

COX-1 mRNA and protein were detectable in control conditions and after IR. However, a late COX-1 mRNA overexpression was observed at 24 and 72 h after reperfusion without a corresponding increase of COX-1 protein. This is the first evidence of COX-1 constitutive expression in skeletal muscle. This constitutive expression could be related to the housekeeping function of COX-1 observed in other tissues. Even though no over-expression of COX-1 occurred in inflammatory and injury conditions, a role of COX-1 cannot be ruled out. Indeed it has been demonstrated that basal COX-1 expression, despite up-regulation of COX-2, is sufficient to have a crucial role in gastric mucosa defense (4, 5, 41) and during inflammation (16, 45) in rats. The delayed overexpression of COX-1 mRNA may indicate that COX-1 is involved after the acute phase, i.e. in the recovery phase as the process of muscle regeneration becomes significant 48 hours after reperfusion

(22). However, a recent study indicated that COX-1 activity was not required for normal growth of regenerating myofibers. The inducibility of COX-1 mRNA *in vitro* and *in vivo* has been already demonstrated in the endothelial cells of human umbilical vein (46), mouse intestinal epithelium (8) and rat stomach (15). In our experiment, the induction of COX-1 mRNA levels, without a concomitant increase in COX-1 protein, may be explained by a) post-translational regulation of COX-1, b) insufficient changes in COX-1 protein regarding the constitutive expression, and c) a possible induction of truncated COX-1 protein (COX-1-SV), as previously suggested in other models (10).

In basal conditions, the level of COX-2 mRNA was detectable but no protein was evidenced. IR caused little or no change in COX-2 mRNA expression. In contrast, the moderate IR triggered a large over-expression of COX-2 protein at 6 and 10 hours after reperfusion i.e. during the development of inflammation and muscle injury. These results are in agreement with the COX-2 expression profile previously described in other tissues. Under basal conditions, COX-2 expression was undetectable or low, with a rapid and transient over-expression of mRNA and/or protein of COX-2 after IR, as observed in stomach (26), retina (23), kidney (37) and heart (35).

Western-blot analysis revealed an unexpected molecular weight of 67 kDa for the COX-2 protein. 67 kDa is the predicted approximate mass of the mature non-glycosylated protein. It has been demonstrated that a deglycosylated recombinant human COX-2 protein retains activity while its stability appears to be diminished (1, 31). An absence of mRNA overexpression coupled with overexpression of the protein, has been previously observed for COX-2 in rat bladder inflammation (44) and in skeletal muscle during the early stages of muscle regeneration (Bondesen, 2004). *In vitro* studies demonstrated that the COX-2 control elements of the 3'untranslated region mediate post-transcriptional regulation by changing mRNA stability and translational efficiency (11, 17). In rat skeletal muscle, inhibitors of mRNA synthesis prevent the production of prostaglandins (PG) by blocking the COX step suggesting that the COX-encoding mRNA should be degraded very rapidly (half-life 5-10 min)(13). Thus, our COX-2 mRNA results may be explained by extreme instability of the mRNA. Thus, skeletal muscle IR may trigger a transient up-regulation of the

COX-2 protein and/or mRNA which can rapidly be inactivated. Such results suggest a transitory role of COX-2 in pathophysiological IR in skeletal muscle.

The skeletal muscle IR is recognized as a form of acute inflammation. The reperfusion phase initiates a complex series of reactions leading to edema formation which prevents microvascular perfusion and increases the severity of muscle injuries (18). The time course of COX-2 over-expression associated with the formation of edema suggests that COX-2 might play a role in the pathophysiology of IR-induced muscle injury. It has been recently evidenced that selective inhibition of COX-2 activity is associated with the decrease of intramuscular inflammatory cells in the early stage of skeletal muscle regeneration (3). However, no leucocyte infiltration was revealed in our study. Although COX-2 is a key enzyme involved in the inflammation process, COX-2 may not be only involved in leucocytes infiltration. COX-2 may also be involved in muscle cell cytotoxicity through an intrinsic mechanism. Indeed, a previous *in vitro* study indicates that a non selective COX inhibitor partially blocks a stretch-induced muscle cell damage (42). The beneficial or detrimental effect of COX activity on IR-induced muscle injury remains to be elucidated. Some studies indicate that dexamethasone, which is known to decrease COX activity in skeletal muscle (7), improves the survival of ischemic-reperfused muscle (27). However, these data are not necessary predictive of the efficacy of COX-2 inhibitors in preventing IR damage.

In conclusion, our study evaluated COX-1 and COX-2 expression in skeletal muscle after basal and moderate IR injury. Our results are in agreement with those reported in various tissue injury models, showing a constitutive basal expression of COX-1 and the up-regulation of COX-2 during the acute injury phase. These results may be useful for the understanding of COX in the development stages of muscle ischemia injury, and should encourage further studies, especially the pharmacological blocking of COX-1 and COX-2 with selective NSAIDs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank N. GAUTIER and V. GASCIOLLI for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. **Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, and et al.** Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1209: 130-139, 1994.
2. **Blaisdell FW.** The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 10: 620-630, 2002.
3. **Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, and Pavlath GK.** The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C475-483, 2004.
4. **Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Pajdo R, Pawlik M, Brzozowska I, and Hahn EG.** Expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress. *J Physiol Paris* 94: 83-91, 2000.
5. **Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Stachura J, Pajdo R, and Hahn EG.** Role of prostaglandins generated by cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in healing of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. *Eur J Pharmacol* 385: 47-61, 1999.
6. **Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
7. **Chromiak JA and Vandeburgh HH.** Mechanical stimulation of skeletal muscle cells mitigates glucocorticoid-induced decreases in prostaglandin production and prostaglandin synthase activity. *J Cell Physiol* 159: 407-414, 1994.
8. **Cohn SM, Schloemann S, Tessner T, Seibert K, and Stenson WF.** Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* 99: 1367-1379, 1997.
9. **Dammers R, Wehrens XH, oude Egbrink MG, Slaaf DW, Kurvers HA, and Ramsay G.** Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 88: 816-824, 2001.
10. **DeWitt DL and Meade EA.** Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 306: 94-102, 1993.

11. **Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, and Prescott SM.** Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750-11757, 2000.
12. **Evett GE, Xie W, Chipman JG, Robertson DL, and Simmons DL.** Prostaglandin G/H synthase isoenzyme 2 expression in fibroblasts: regulation by dexamethasone, mitogens, and oncogenes. *Arch Biochem Biophys* 306: 169-177, 1993.
13. **Fagan JM and Goldberg AL.** Inhibitors of protein and RNA synthesis cause a rapid block in prostaglandin production at the prostaglandin synthase step. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2771-2775, 1986.
14. **Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, and Hwang D.** Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 307: 361-368, 1993.
15. **Ferraz JG, Sharkey KA, Reuter BK, Asfaha S, Tigley AW, Brown ML, McKnight W, and Wallace JL.** Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology* 113: 195-204, 1997.
16. **Gilroy DW, Tomlinson A, and Willoughby DA.** Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 355: 211-217, 1998.
17. **Gou Q, Liu CH, Ben-Av P, and Hla T.** Dissociation of basal turnover and cytokine-induced transcript stabilization of the human cyclooxygenase-2 mRNA by mutagenesis of the 3'-untranslated region. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 508-512, 1998.
18. **Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, and Korthuis RJ.** Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 179: 169-187, 1998.
19. **Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA, and Stewart AG.** Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 424: 59-67, 2001.
20. **Horder M, Jorgensen PJ, Hafkenscheid JC, Carstensen CA, Bachmann C, Bauer K, Neuwald C, Rosalki SB, Foo AY, and Vogt W.** Creatine kinase determination: a European evaluation of the creatine kinase determination in serum, plasma and whole blood with the Reflotron system. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29: 691-696, 1991.

21. **Hurley SD, Olschowka JA, and O'Banion MK.** Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *J Neurotrauma* 19: 1-15, 2002.
22. **Jennische E.** Rapid regeneration in postischaemic skeletal muscle with undisturbed microcirculation. *Acta Physiol Scand* 128: 409-414, 1986.
23. **Ju WK, Kim KY, and Neufeld AH.** Increased activity of cyclooxygenase-2 signals early neurodegenerative events in the rat retina following transient ischemia. *Exp Eye Res* 77: 137-145, 2003.
24. **Kennedy BP, Chan CC, Culp SA, and Cromlish WA.** Cloning and expression of rat prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 494-500, 1993.
25. **Kerrigan CL and Stotland MA.** Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 14: 165-175, 1993.
26. **Kishimoto Y, Wada K, Nakamoto K, Kawasaki H, and Hasegawa J.** Levels of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression at various stages of acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Arch Biochem Biophys* 352: 153-157, 1998.
27. **Knight KR, Zhang B, Morrison WA, and Stewart AG.** Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 332: 273-278, 1997.
28. **Kvien TK and Viktil K.** Pharmacotherapy for regional musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 17: 137-150, 2003.
29. **Lefebvre HP, Laroute V, Braun JP, Lassourd V, and Toutain PL.** Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release. *Vet Res* 27: 343-361, 1996.
30. **Okamoto T and Hino O.** Expression of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA in rat tissues: tissue-specific difference in the expression of the basal level of mRNA. *Int J Mol Med* 6: 455-457, 2000.
31. **Percival MD, Bastien L, Griffin PR, Kargman S, Ouellet M, and O'Neill GP.** Investigation of human cyclooxygenase-2 glycosylation heterogeneity and protein expression in insect and mammalian cell expression systems. *Protein Expr Purif* 9: 388-398, 1997.
32. **Planas AM, Soriano MA, Justicia C, and Rodriguez-Farre E.** Induction of cyclooxygenase-2 in the rat brain after a mild episode of focal ischemia without tissue inflammation or neural cell damage. *Neurosci Lett* 275: 141-144, 1999.

33. **Racz IB, Illyes G, Sarkadi L, and Hamar J.** The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. *Eur Surg Res* 29: 254-263, 1997.
34. **Institute of Laboratory Animals Resources.** Guide for the care and use of laboratory animals. Washington. DC : National Research Council, 1996.
35. **Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, and Bolli R.** Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10197-10202, 2000.
36. **Skjeldal S, Torvik A, Groggaard B, Nordsletten L, and Lyberg T.** Histological studies on postischemic rat skeletal muscles. With emphasis on the time of leukocyte invasion. *Eur Surg Res* 25: 348-357, 1993.
37. **Slimane MA, Ferlicot S, Conti M, Droupy S, Cosson C, Paradis V, Loric S, Bedossa P, Gauthier F, Legrand A, Benoit G, and Eschwege P.** Expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin E synthase after renal ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 34: 2841-2842, 2002.
38. **Strock PE and Majno G.** Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 129: 309-318, 1969.
39. **Summan M, McKinstry M, Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Brumbaugh K, Luster MI, and Simeonova PP.** Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis. *J Interferon Cytokine Res* 23: 237-245, 2003.
40. **Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, and Wu R.** Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485-2502, 1985.
41. **Ukawa H, Yamakuni H, Kato S, and Takeuchi K.** Effects of cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs on mucosal ulcerogenic and healing responses of the stomach. *Dig Dis Sci* 43: 2003-2011, 1998.
42. **Vandenburgh HH, Hatfaludy S, Sohar I, and Shansky J.** Stretch-induced prostaglandins and protein turnover in cultured skeletal muscle. *Am J Physiol* 259: C232-240, 1990.
43. **Vandenburgh HH, Shansky J, Solerssi R, and Chromiak J.** Mechanical stimulation of skeletal muscle increases prostaglandin F2 alpha production,

cyclooxygenase activity, and cell growth by a pertussis toxin sensitive mechanism. *J Cell Physiol* 163: 285-294, 1995.

44. **Wheeler MA, Yoon JH, Olsson LE, and Weiss RM.** Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E(2) production are up-regulated in a rat bladder inflammation model. *Eur J Pharmacol* 417: 239-248, 2001.

45. **Wilborn J, DeWitt DL, and Peters-Golden M.** Expression and role of cyclooxygenase isoforms in alveolar and peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 268: L294-301, 1995.

46. **Xu XM, Tang JL, Hajibeigi A, Loose-Mitchell DS, and Wu KK.** Transcriptional regulation of endothelial constitutive PGHS-1 expression by phorbol ester. *Am J Physiol* 270: C259-264, 1996.

47. **Zhang B, Knight KR, Dowsing B, Guida E, Phan LH, Hickey MJ, Morrison WA, and Stewart AG.** Timing of administration of dexamethasone or the nitric oxide synthase inhibitor, nitro-L-arginine methyl ester, is critical for effective treatment of ischaemia-reperfusion injury to rat skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 93: 167-174, 1997.

FIGURES

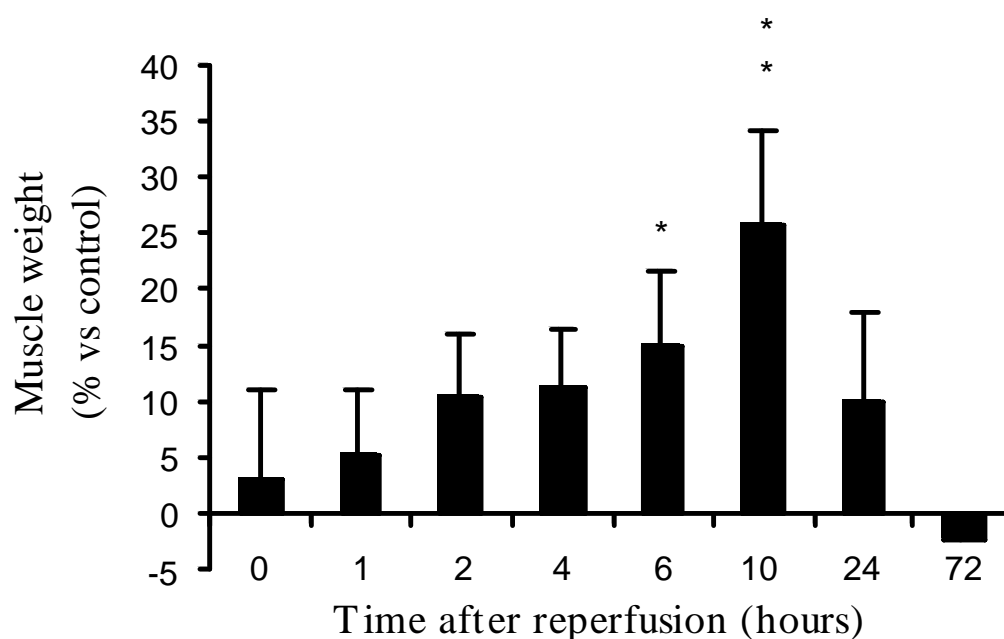


Figure 1 :

Effect of 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion on gastrocnemius muscle weight (used as an indirect marker of edema). Time 0 corresponds to the start of reperfusion. Data are expressed as percentage increase of muscle weight following ischemia-reperfusion vs contralateral control (mean \pm SD). Data were subjected to an analysis of variance followed by a Dunnett's test for comparison with the control value (2 hours ischemia and no reperfusion). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

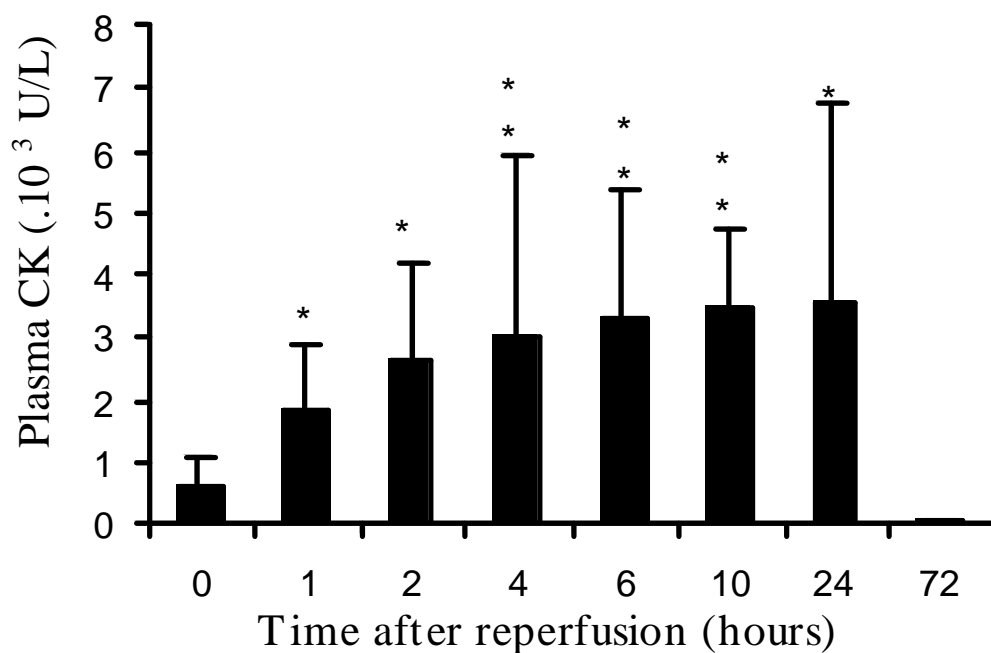


Figure 2 :

Effect of 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion on plasma creatine kinase activity (CK). Time 0 corresponds to the start of reperfusion. Data are expressed as U/L (mean \pm SD). Data were subjected to an analysis of variance after log transformation of the data followed by a Dunnett's test for comparison with the control value (2 hours ischemia and no reperfusion). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

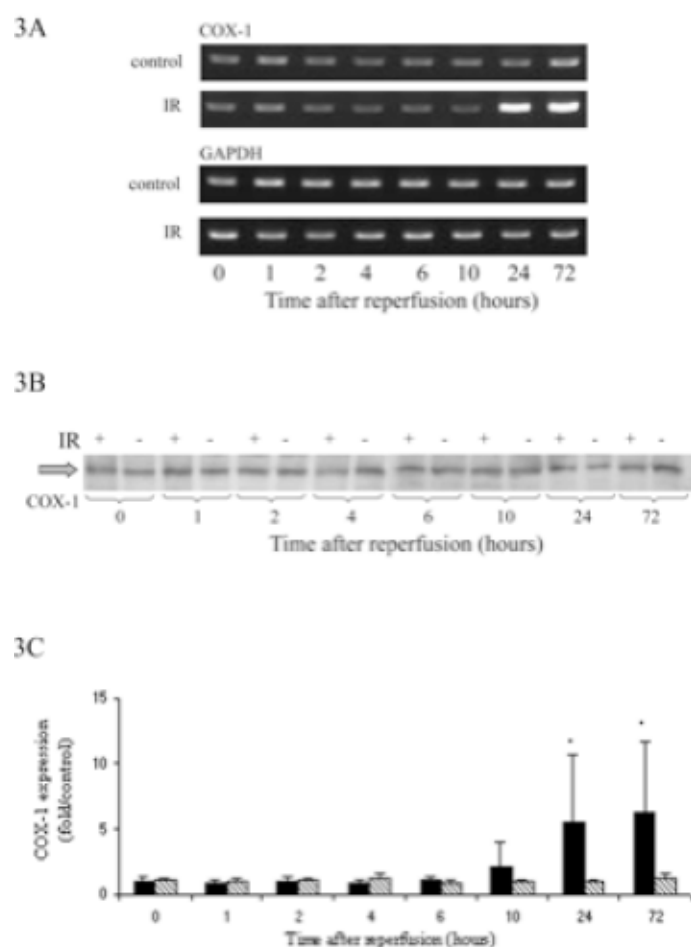


Figure 3 :

Effect of 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion on COX-1 mRNA and protein expression in gastrocnemius muscle. **A** : representative RT-PCR profile of COX-1 and GAPDH mRNA expression from a single cDNA dilution titer. **B** : COX-1 immunoreactivity in muscle after 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion (+) and contralateral control muscle (-). Representative western blots of muscle extracts at each time of tissue collection are shown. Solubilized microsomes (100 µg/lane) were probed with anti-COX-1 1/250. The hybridization signal was revealed by enhanced chemiluminescence. **C** : Densitometric analysis : relative COX-1/GAPDH mRNA abundance was determined by semi-quantitative analysis. Data were expressed as fold increase of COX-1 expression in ischemia-reperfusion vs control contralateral muscle (mean ± SD). Data were subjected to an analysis of variance followed by a Dunnett's test for comparison with the control value (2 hours ischemia and no reperfusion). *P<0.05.

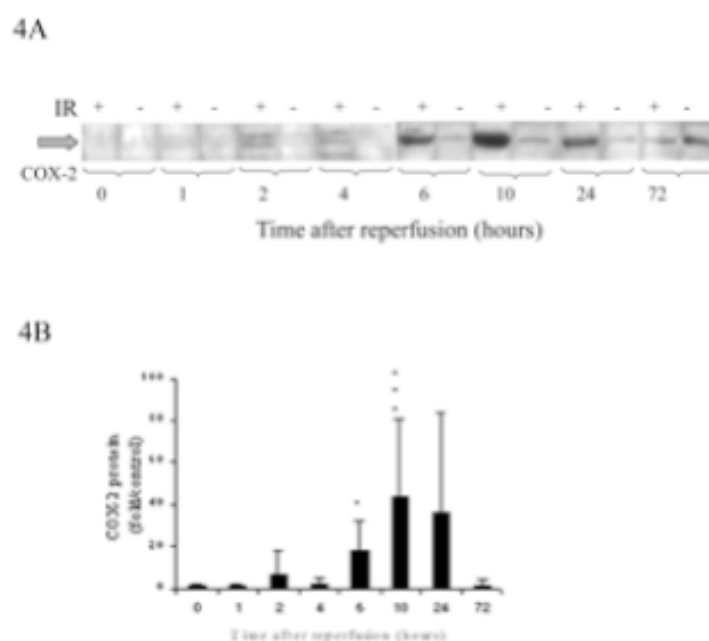


Figure 4 :

A: Effect of 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion on COX-2 protein expression in gastrocnemius muscle. A : COX-2 immunoreactivity in muscle after 2 hours hindlimb ischemia and 0 to 72 hours of reperfusion (+) and contralateral control muscle (-). Representative western blots of muscle extracts at each time of tissue collection are shown. Solubilized microsomes (100 µg/lane) were probed with anti-COX-1 1/250 and anti-COX-2 1/200. The hybridization signal was revealed by enhanced chemiluminescence.

B: Densitometric analysis : Data were expressed as fold COX-2 protein in control (fold background) in ischemia-reperfusion vs control contralateral muscle (mean ± SD).). Data were subjected to an analysis of variance (after log transformation for COX-2 protein) of the data followed by a Dunnett's test for comparison with the control value (2 hours ischemia and no reperfusion). *P<0.05, ***P<0.001.

2. Etude 2 - Conséquences lésionnelles, rôle des COX dans la régénération des lésions musculaires iatrogènes (non publié)

Problématique : L'expression des COX-1 et COX-2 a été mise en évidence dans le muscle strié squelettique après une ischémie-reperfusion expérimentale (voir l'étude 1). Or, il a été vu préalablement que l'inhibition des COX dans différents tissus, en plus de l'action anti-inflammatoire retardait ou empêchait la cicatrisation tissulaire (voir la partie bibliographique).

Objectif : Evaluer les effets d'une inhibition des COX-1 ou COX-2 sur la régénération fonctionnelle et lésionnelle du muscle soumis à une lésion iatrogène modèle.

Matériels et méthodes : Des lésions musculaires iatrogènes ont été induites par le PG chez le rat. Trois groupes de 9 rats Wistar (Harlan France, ZA Le Marcoulet, Gannat, France) ont été constitués :

- Groupe 1 : Traitement par un AINS inhibiteur des COX-2 (nimésulide 5 mg/kg/jour, IP)
- Groupe 2 : Traitement par un AINS inhibiteur mixte des COX-1 et COX-2 (indométhacine 5 mg/kg/jour, IP)
- Groupe 3 : Témoin recevant un même volume de chlorure de sodium isotonique (IP)

Trente minute après le premier traitement, une lésion musculaire a été induite chez tous les animaux par une administration IM de PG au centre du muscle *Gastrocnemius*, sous anesthésie à l'isoflurane. La température locale du muscle injecté et du muscle controlatéral a été mesurée une fois par jour avec un thermomètre à infrarouges et à visée laser (Raytech modèle RAYMX4CFF, Fisher Bioblock, France). L'aptitude des rats à se déplacer pendant une minute sur un dispositif de type « rota-rod » (diamètre = 3 cm, rotation = 14 trs/min, Modèle type 011338, Apelab, 92220 Bagneux, France) a été évaluée après chaque mesure de la température cutanée, les rats ayant été entraînés à se déplacer sur le dispositif quotidiennement pendant une semaine avant l'administration IM. Trois animaux ont été euthanasiés dans chaque groupe à 4, 10 et 18 jours après l'administration de PG dans le muscle pour permettre l'évaluation de la lésion, directement d'abord puis

après coloration au triphényltétrazolium (20 minutes, puis décoloration au formaldéhyde 4 %).

Résultats : Aucune différence de comportement locomoteur ni d'étendue des lésions musculaires n'a été mise en évidence entre les différents groupes d'animaux.

La température mesurée au site injecté était inférieure à la température du muscle témoin controlatéral pour tous les groupes, mais de manière plus marquée pour les groupes 1 et 2 (nimésulide et indométhacine) par rapport au groupe témoin (chlorure de sodium isotonique 0,9 %) (voir figure 17).

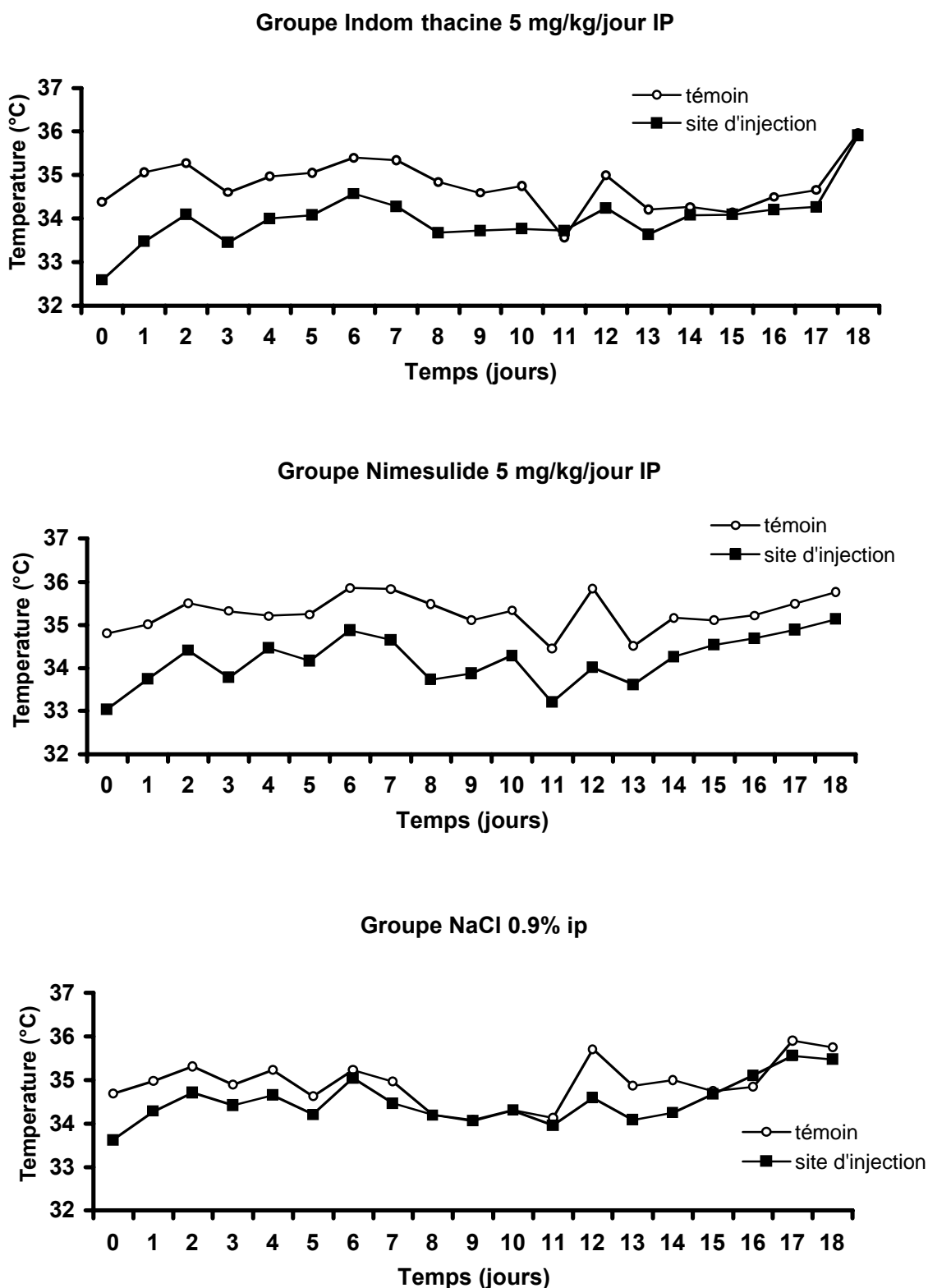


Figure 17- Evolution de la température cutanée du site d'injection et du site témoin controlatéral après administration IM de PG chez le rat.

B. Etude des débits sanguins musculaires

Cette partie a eu pour objet l'étude de la répartition et de l'évolution au cours du temps de la perfusion sanguine dans les différentes parties d'une lésion musculaire iatrogène en phase aiguë.

1. Etude 1 - Mise au point méthodologique (non publié)

Problématique : La méthode choisie pour la mesure quantitative et absolue des débits sanguins est la technique des microsphères marquées en fluorescence chez le lapin. La technique de mesure des débits sanguins par les microsphères marquées en fluorescence n'avait jamais été utilisée dans le muscle soumis à une lésion iatrogène. Plusieurs points de méthodologie étaient à vérifier avant de démarrer une étude complète.

Objectifs : - Mener une étude préliminaire pour évaluer la quantité de microsphères à administrer *in toto*, et choisir au mieux les temps de mesure des débits après l'injection IM.

- Réaliser des coupes histologiques pour vérifier la localisation intravasculaire des microsphères au sein de la lésion musculaire.

Matériels et méthodes : La méthode a été mise au point par une étude sur 4 lapins après une administration IM d'une formulation d'oxytétracycline longue action dans le muscle *Longissimus dorsi*. Brièvement, les lapins ont été anesthésiés à l'isoflurane, et équipés chirurgicalement de cathéters pour l'administration des microsphères et pour le prélèvement de sang artériel de référence (voir la partie bibliographique). Deux lapins ont été utilisés pour la mesure des débits sanguins locaux, les 2 autres pour l'examen histologique.

Histologie : Des microsphères ont été administrées 30 min et 1 h après l'injection IM. Les muscles prélevés ont été fixés au formaldéhyde, puis inclus en paraffine en utilisant une technique spécifique qui préserve le polystyrène, évitant ainsi la dissolution des microsphères (FMRC, 1999). Les lames histologiques ont été gardées à l'abri de la lumière et examinées en lumière conventionnelle et en fluorescence.

Mesure des débits sanguins : Le premier lapin a reçu par voie IM 1 mL de la formulation d'oxatétracycline (et 1 mL de chlorure de sodium isotonique dans le muscle controlatéral), tandis que le second a reçu 2 mL (et 2 mL de NaCl dans le muscle controlatéral). Cinq administrations successives de 2,000,000 de microsphères diluées dans 6 mL de NaCl isotonique, et marquées par différents composés fluorescents ont été effectuées (couleurs « yellow-green », « orange-red », « red », « crimson » et « scarlet »). Les mesures de débit ont été réalisées juste avant l'administration IM (contrôle), puis 10, 30, 60 min et 3 h après. Les muscles ont été prélevés, découpés en zones autour du centre de la lésion, puis fixés au formaldéhyde. Après l'étape d'extraction des microsphères et dosage en fluorescence, les débits sanguins ont été calculés (voir la méthode dans l'article 4).

Résultats : L'histologie a permis de détecter dans les tissus les microsphères administrées, et de valider leur localisation dans les capillaires sanguins (voir figure 18), rendant possible l'utilisation de la technique des microsphères dans le tissu musculaire modifié par la lésion.

Les valeurs absolues du débit sanguin musculaire mesuré étaient cohérentes avec les données bibliographiques. Une augmentation globale très nette du débit sanguin dans le muscle injecté par rapport au muscle controlatéral a été mise en évidence, avec un début de retour aux valeurs basales 3 h après l'induction de la lésion. Cette étude a validé la mise au point de la technique et a permis d'ajouter une mesure de débit à 6 h après l'administration dans l'étude principale.

2. Etude 2 - Etude principale (Article 4)

Problématique : Lors de l'évaluation des méthodes de quantification des lésions musculaires *in vivo*, une évolution biphasique de la température a été observée au site d'injection, avec une hypothermie transitoire suivie d'une hyperthermie (voir plus haut, article 1). Un parallèle a été alors suggéré par rapport aux processus décrits en traumatologie musculaire ou dans l'infarctus du myocarde, le développement aigu de la lésion semblant évoquer un phénomène d'ischémie-reperfusion, donc des modifications éventuelles de débit sanguin.

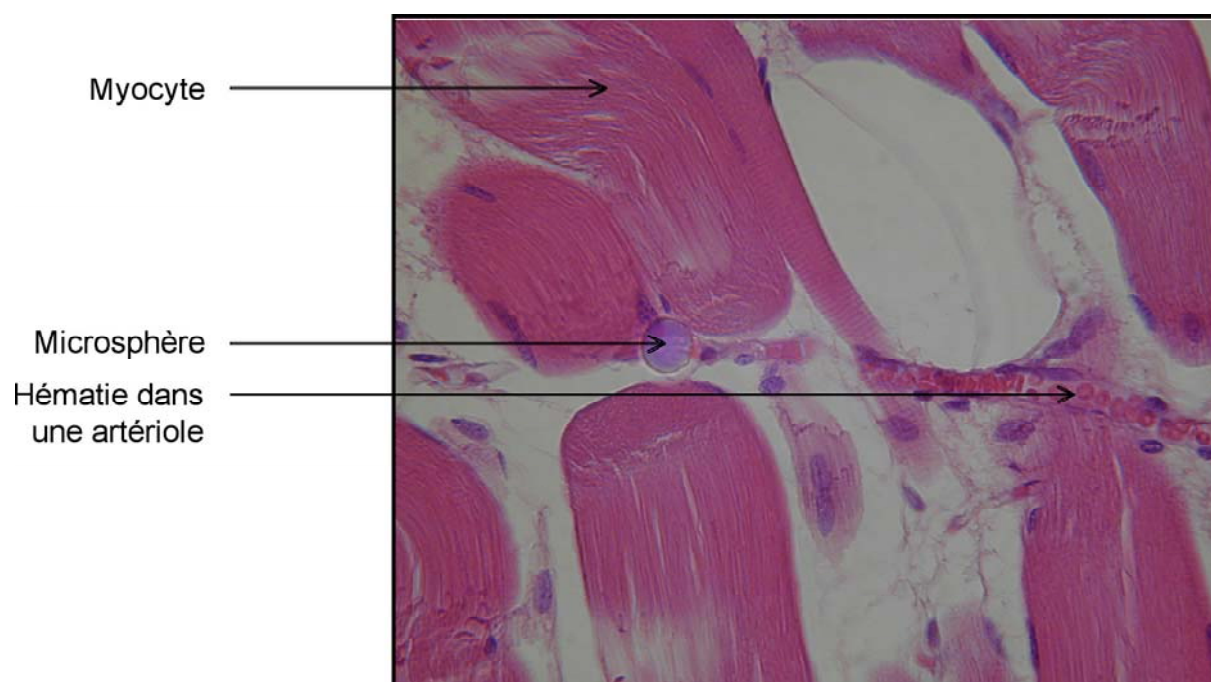


Figure 18 – Examen histologique du muscle de lapin après administration de microsphères marquées en fluorescence. Coloration hémalun-éosine.

Objectifs : Documenter l'évolution des débits sanguins locaux après une administration de PG dans le muscle chez le lapin pendant la phase lésionnelle aiguë, et tester certaines voies physiopathologiques hypothétiquement impliquées (contraction musculaire, calcium intracellulaire, voie des prostanoïdes inflammatoires et inflammation neurogénique).

Matériels et méthodes : La mesure des débits sanguins a été effectuée pendant 6 h suivant l'administration IM de 3 volumes de PG et a permis d'évaluer aussi l'influence de modulateurs pharmacologiques sur le développement de la lésion. Les modulateurs choisis ont été un agent bloquant la jonction neuromusculaire (agent curarisant : pancuronium), un inhibiteur calcique, spécifique du muscle squelettique (dantrolène), un inhibiteur des cyclooxygénases 1 et 2 (indométhacine), et un agent inhibiteur de la transmission des signaux de l'inflammation neurogénique (antagoniste de la substance-P : SR140333).

Résultats : Les résultats montrent que le muscle injecté subit une augmentation globale de débit sanguin importante mais transitoire. Cependant, le découpage du muscle a montré que la lésion musculaire est à la fois le siège d'une chute et d'une hausse importante de débit, observées simultanément dans des zones différentes. Le phénomène physiopathologique observé est plutôt une coexistence spatiale d'hypoperfusion et d'hyperperfusion musculaire qu'une succession temporelle d'ischémie puis reperfusion. La figure 19 montre les différentes zones lésionnelles correspondant aux mesures de débit sanguin.

En présence des modulateurs pharmacologiques, l'augmentation de débit est réduite. La masse de muscle nécrosé en zone centrale n'est pas modifiée, mais la masse de muscle atteint en périphérie est réduite par le dantrolène, l'indométhacine et le SR140333. Les contractions musculaires visibles au moment de l'administration dans le muscle sont abolies par le pancuronium, mais cet agent ne modifie pas l'étendue des lésions musculaires observées.

En conclusion, le mécanisme lésionnel induit par l'administration IM de molécules irritantes est vraisemblablement multifactoriel puisque le dantrolène, l'indométhacine et le SR140333 inhibent le développement aigu des lésions.

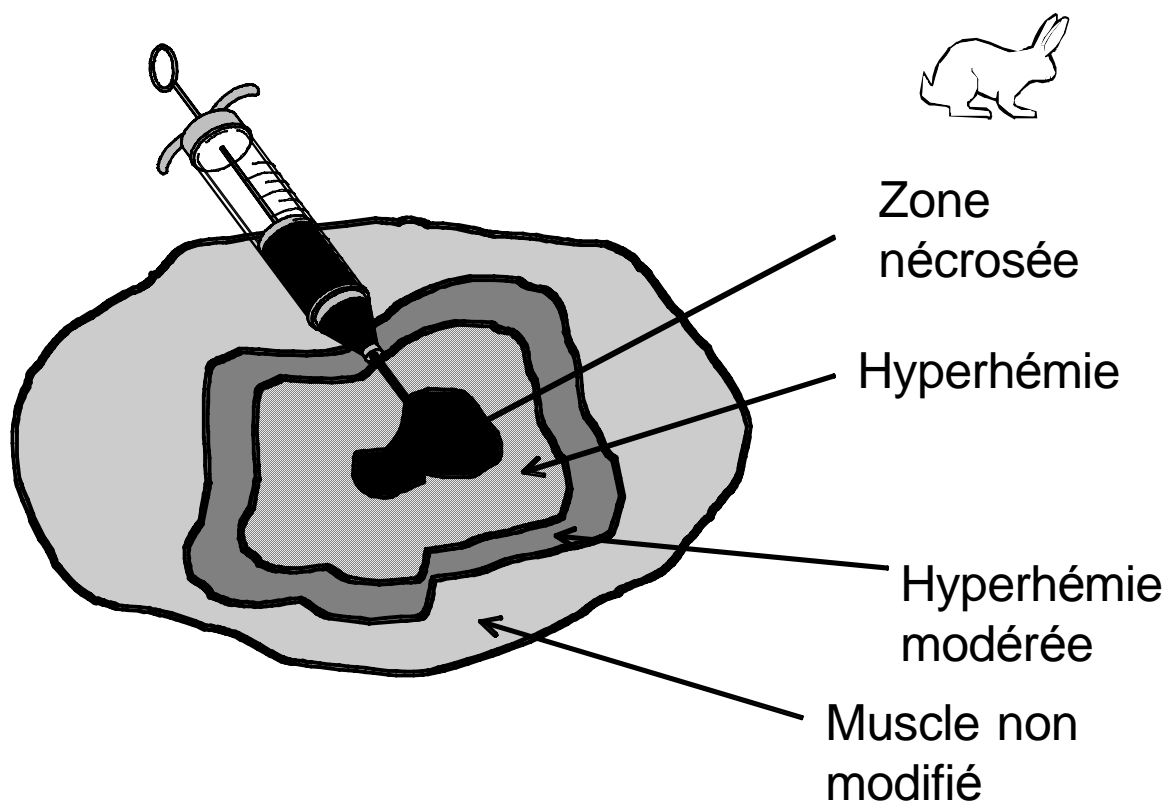


Figure 19 – Cartographie lésionnelle schématisée du muscle *Longissimus dorsi* 6 heures après administration de PG chez le lapin

Article 4 :

Acute changes in muscle blood flow and concomitant muscle damage following an intramuscular administration

Ferré PJ, Thein E, Raymond-Letron I, Toutain PL, Lefebvre HP

Pharmaceutical Research, 2005 March ; 22(3) : 405-412.

Research Paper

Acute Changes in Muscle Blood Flow and Concomitant Muscle Damage after an Intramuscular Administration

Pierre Jean Ferré,^{1,2} Eckart Thein,³ Isabelle Raymond-Letron,² Pierre-Louis Toutain,^{1,2} and Hervé Pierre Lefebvre^{1,2,4}

Received July 30, 2004; accepted November 29, 2004

Purpose. The intramuscular route (IM) is widely used but commonly induces injection site muscle damage. This study investigates the hemodynamic changes in an acute lesion induced by the IM administration of propylene glycol (PG) in rabbits.

Methods. Control groups received 1, 2, or 3 ml of PG (IM). Others were pretreated with pancuronium, dantrolene, indomethacin, or SR140333 and then received 2 ml of PG. The muscle blood flow (MBF) was assessed using fluorescent microspheres before and at 15, 45, 60, 90 min, 3 and 6 h after IM administration. Different areas within the muscle damage were quantified.

Results. Muscle contractions as well as a transient but major MBF increase were observed at the injection site. All treatments reduced hyperemia by up to 81% (dantrolene, 15 min) at 15, 45, and 90 min ($p < 0.05$). MBF had returned to basal values in all groups at 6 h. The central necrotic area was not modified, but peripheral damage (8.0 ± 1.3 g) was reduced by dantrolene, indomethacin, and SR140333 ($p < 0.05$), but not by pancuronium.

Conclusions. Muscle contraction and hyperemia are not responsible for muscle damage at the injection site, which is the multifactorial phenomenon, involving intracellular calcium and inflammation.

KEY WORDS: fluorescent microspheres; intramuscular administration; muscle blood flow; propylene glycol; skeletal muscle damage.

INTRODUCTION

The intramuscular (IM) route is widely used for drug administration. It was estimated in a study from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program that 46% of patients received at least one IM administration during hospitalization (1). The IM route has many advantages over other routes of administration and often allows the use of drugs that are unsuitable for oral or intravenous administration. However, IM administrations commonly induce skeletal muscle damage and patient discomfort or pain. The muscle damage occurring during IM administration or soon after is mainly associated with pain, swelling, redness, and movement discomfort. There are also chronic consequences with local fibrosis of the muscles leading to muscle contractures (2), and abscesses (3) or nerve injury (4) have also been described.

Several studies focusing on different factors that could influence the extent of muscle damage are available. The influence of the nature of the actual drug, the vehicle, the pH of the solution, injected volume, concentration, viscosity, and speed of injection in the tissue have been documented (5). Paradoxically, very few studies are available on the pathophysiology of such muscle damage. Vasoactive events may be apparent during the acute phase of damage development after IM administration. Gross pathologic examination of the drug-induced lesions, usually reveals signs of inflammation and pathologic modifications in the microvasculature (hemorrhage, thrombosis, sludge, etc.). The skin temperature above the injection site was shown to change during the hours following IM administration in an ovine model (6). The temperature decreased during the first hour after the IM administration of 5 ml of a long-acting formulation of oxytetracycline, and this transient hypothermia was followed by local hyperthermia. This suggested that changes in skin and/or skeletal muscle blood flow (MBF) occurred and that the local muscle damage induced by an IM drug administration could involve a syndrome of ischemia-reperfusion (IR). In the current study, we used propylene glycol, an organic cosolvent that is used in many drug formulations and known for its poor local tolerability (5). We performed IM administrations in the rabbit to more precisely document the distribution and evolution of the actual blood flow in the injected muscle and to assess the effect of selected pharmacological modulators on these changes and concomitantly the extent of muscle damage at the injection site.

¹ UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA-ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 03, France.

² Département des Sciences biologiques et fonctionnelles, Ecole Nationale Vétérinaire, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 03, France.

³ Institute for Surgical Research, Klinikum Grosshadern, 81377 Munich, Germany.

⁴ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: h.lefebvre@envt.fr)

ABBREVIATIONS: DAN, dantrolene; IM, intramuscular; IND, indomethacin; LD, *lumbar longissimus dorsi* muscle; MBF, muscle blood flow; MS, microspheres; PAN, pancuronium bromide; PG, propylene glycol; SPA, substance-P receptor antagonist.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Two experiments were performed: First, the distribution and the evolution of skeletal MBF were assessed in rabbits after the IM administration of increasing volumes of PG (1, 2, and 3 ml). In a second experiment, the skeletal MBF was similarly analyzed in rabbits pretreated with selected pharmacological agents.

The IM administration was performed into the left *lumbar longissimus dorsi* muscle (LD) of the anesthetized rabbit. The contralateral noninjected muscle was used as a reference. Fluorescent microspheres (MS) were administered in the left atrium of the heart after catheterization of the carotid artery and were used to assess blood flow in several organs and in the investigated muscles. Six MS solutions with different fluorescent dyes were used, once before the IM administrations, and at 5 critical times (i.e., 10, 30 min, 1, 3, and 6 h postinjection). At each administration of MS, a reference blood sample was collected from a carotid artery to allow calculation of the cardiac output and absolute quantification of the local blood flow. The rabbits were euthanized immediately after the final administration of MS.

Animals and Husbandry

New Zealand male rabbits (3 to 5 kg body weight) were purchased from Harlan France (ZI Le Marcoulet, Gannat, France) and acclimated to the experimental conditions for several weeks.

The animals were kept at the National Veterinary School of Toulouse, in facilities that are approved by the French Ministry of Agriculture in accordance with the current guidelines for animal care and use, and the research adhered to the Principles of Laboratory Animal Care (NIH Publication No. 85-23, revised 1985). They were housed individually in stainless steel, wire-bottom cages, and provided with commercial rabbit chow and tap water *ad libitum*. They were subjected to daily observation throughout the experimental phases.

Chemicals and Drugs

Propylene glycol (PG) or 1,2-propanediol of analytical grade was purchased from Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France). The anesthetized rabbits were positioned in sternal recumbency. The lumbar area was thoroughly shaved. PG was injected in a standardized manner using a 15-mm-long 23-gauge needle inserted perpendicularly to the lumbar area into the middle of the left LD muscle. The contralateral noninjected muscle was also shaved and used as a control.

Pancuronium bromide ($0.25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was purchased from Organon S.A. (Puteaux, France) as a commercial solution for intravenous use (Pavulon: 4 mg of pancuronium/2 ml).

Dantrolene sodium (IV bolus of 1.5 mg/kg and infusion of $1.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was purchased from Merck Lipha Santé (Lyon, France) as a commercial solution for intravenous use (Dantrium: 20 mg of lyophilizate to be dissolved extemporaneously in 60 ml of sterile water).

Indomethacin (IV bolus of 3.2 mg/kg and infusion of $450 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was purchased as a powder of analytical grade from Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France) and was prepared in solution (2 mg/ml) as described previously (7).

SR140333 (IV bolus of $100 \text{ } \mu\text{g/kg}$ and infusion of $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a potent nonpeptidic antagonist of NK-1 receptors, was generously provided by Dr. X. Emonds-Alt, Sanofi Research (Montpellier, France). It was prepared extemporaneously by dilution in saline.

Treatment Groups

Seven groups of four rabbits were used: The control groups CON1, CON2, and CON3 were not pretreated and received increasing doses of PG (1, 2, and 3 ml for groups CON1, CON2, and CON3, respectively) by intramuscular administration. The PAN group was intravenously infused with pancuronium (PAN). The DAN group received an intravenous infusion of dantrolene. The IND group was treated with indomethacin. The SPA group received an intravenous infusion of SR140333, an antagonist of the receptors for substance P. The selected dosage for SR140333 had been previously demonstrated (data not shown) to completely inhibit substance-P-induced hypotension in the rabbit (8). All treated rabbits received an intramuscular administration of 2 ml PG, similarly to group CON2.

Surgical Preparation

Anesthesia was induced by isoflurane delivered to the rabbit through a face mask. After tracheal intubation, the animals were anesthetized with 2.6% isoflurane supplied in 100% oxygen. Artificial ventilation was provided when needed. Body temperature was maintained by a heating blanket programmed to a set value of 39.5°C . The rabbit's eyes were lubricated with ophthalmic gel (Ocrygel, TVM, Lempdes, France) to prevent corneal drying. Anesthetic parameters were monitored continuously during anesthesia using an integrated system (Omnicare HP M1166A, Hewlett-Packard GmbH, Boeblingen, Germany): The inspired and end-tidal concentrations of the anesthetic gas were measured and continuously displayed using a gas analyzer (HP M1026A, Hewlett-Packard GmbH) connected to the endotracheal tube (HP 13905A, Hewlett-Packard GmbH). A lead-II electrocardiogram was continuously monitored (HP M1001A, Hewlett-Packard GmbH).

After reaching stable anesthesia, the animals were placed in a supine position. The right and left common carotid arteries were gently isolated from the connective tissues and nerves. A 20-gauge polyurethane catheter (Ref. 681037/681038, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) was connected to a transducer and a pressure monitoring system, and was introduced through the left carotid artery and advanced into the left atrium for injection of the MS. The correct position of the catheter in the left atrium was identified by the typical pressure patterns of the left atrium and ventricle displayed by the monitoring system. For the collection of arterial blood, an 18-gauge catheter (Ref. 681037/681038, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) was introduced through the right carotid artery and connected to a pressure transducer.

The myoelectrical activity of the injected LD muscle was registered in a separate group of anesthetized rabbits with an electroencephalogram machine (mini VIII; Alvar, Paris, France).

Measurement of Skeletal Muscle Blood Flow

Polystyrene MS $15 \text{ } \mu\text{m}$ in diameter with 6 different fluorescent labelings (i.e., blue, blue-green, yellow-green, orange,

red, crimson and scarlet) were chosen (Fluospheres, diameter: 15 μm , Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The MS were vortexed for 3 min, sonicated for 5 min, vortexed again for 3 min, and diluted in 0.9% saline to a total volume of 5.5 ml. An aliquot of the diluted solution was stored for determination of the total fluorescence administered. The rabbits received six administrations of MS: Once before the IM administration (control value) and at 5 successive time-points (10, 30, and 90 min, and 3 and 6 h) after the IM administration. The MS were injected within 1 min through the carotid catheter into the left atrium, to permit uniform mixing of the MS in the circulation. Simultaneously, a reference blood sample was withdrawn from the right carotid on citrate anticoagulation stabilizer at a known rate (3 ml/min) using silicon tubing (Masterflex L/S 13, model no. EL-96400-13, Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) connected to a peristaltic pump (Masterflex L/S, model no. 7523-27, Cole-Parmer Instrument Co.) to allow calculation of the absolute blood flow in the organs.

Organ Sampling

After termination of the experiment by IV administration of an overdose of pentobarbital (pentobarbital sodium, CEVA, Libourne, France), samples from the *quadriceps femoris* muscles and LD muscles from both sides were excised after overnight storage of the carcass at 4°C to facilitate cutting of the muscles in a standardized way. The injected and control sites from the LD muscles were cut transversally into approximately 5-mm-thick slices starting from the center of the injection site. The slices were laid in order on a tray, and three muscular zones could be distinguished on a visual basis: a central zone with white necrotic tissue, red-colored reactive muscle tissue isolated in close periphery to the central zone, and normal surrounding tissue (Fig. 1). The smallest samples from each zone were pooled to obtain global samples of approximately equal weight. The mean weight was 4.5 ± 1.25 g. Each sample was immediately immersed in buffered 4% formaldehyde solution. After fixation, the samples were transferred to specific polyamide woven filtration units (Angelika Gaiser, Kunststoff- und Metallprodukte GmbH, Kapel-Grafenhausen, Germany), and analyzed for fluorescence.

Fluorescence Measurement

Immediately after sampling, the blood samples were filtered through the filtration units using a vacuum tap station. The withdrawal tube was washed with excess isotonic saline.

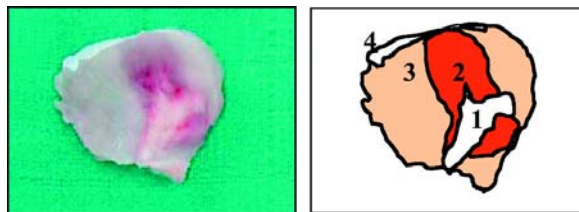


Fig. 1. Representative transversal slice of rabbit *longissimus dorsi* muscle 6 h after the intramuscular administration of propylene glycol (left panel) and the corresponding scheme (right panel) showing 3 main zones (1, center; 2, periphery; 3, normal) and the muscle aponeurosis (4).

The filter tube was placed in the filter holder and closed with a screw-cap.

Filters containing 10 μl of the administered MS diluted solution (3 per each MS administration), blood, or muscle samples, were processed and analyzed for fluorescence (9). Briefly, the organ sample was digested in 4N KOH solution for 6 h at a constant temperature of 60°C. The filter was then rinsed, washed and dried by centrifugation. The fluorescent dyes were released after dissolution of MS by adding 2 ml of cellosolve organic solvent to the filter. The fluorescence intensity was measured using a Perkin-Elmer luminescence spectrometer (LS50B) as described previously (10).

Calculation of Blood Flow

The cardiac output was calculated from the relation:

$$\text{CO} = R \times \frac{\text{fl}_{\text{total}}}{\text{fl}_{\text{ref}}}$$

where CO is the cardiac output (ml/min), R the withdrawal rate of the reference blood sample, fixed by the peristaltic pump (ml/min), fl_{total} is the total fluorescence intensity of the MS administered, and fl_{ref} is the fluorescence intensity in the reference blood sample.

The absolute blood flow to each sample was calculated using the following equation:

$$Q_i = \left(\frac{\text{fl}_i}{\text{fl}_{\text{ref}}} \right) \times R / W_i$$

where Q_i is the blood flow to the sample i ($\text{ml g}^{-1} \text{min}^{-1}$), fl_i its fluorescence intensity, fl_{ref} is the fluorescence intensity of the reference blood sample, R is the withdrawal rate of the reference blood sample (ml/min), and W_i is the weight of the i th sample (g).

The whole blood flow (Q_{control}) for the noninjected contralateral muscle was calculated as the mean of the absolute blood flow of each sample. This value was used to calculate the blood flow variation ($Q_{\text{var-}i}$) in each sample from the injected muscle relative to the noninjected contralateral muscle, used as a control:

$$Q_{\text{var-}i}(\%) = \left(\frac{Q_i - Q_{\text{Control}}}{Q_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

Muscle Pathology

A separate group of rabbits was used for histologic analysis of the injured muscle. IM administrations of 2 ml of PG were performed in anesthetized rabbits as previously described to obtain muscular lesions at 10, 30, and 90 min, and 3 and 6 h after the administrations. Injected and control muscles were sampled and immersed in buffered 4% formaldehyde solution. After fixation, they were dehydrated and embedded in paraffin; 3- μm slices were obtained and stained with H&E. Several slices of each lesion were observed by a trained pathologist.

Statistics

A predictive interval including 95% of the individual values was constructed for each rabbit from the mean MBF values obtained from the muscle samples of the contralateral non-injected muscle. The upper limit of the 95% predictive

interval was defined as the mean MBF value for each time post-administration $+ 1.96 \times \text{SD}$, the lower limit of the predictive interval $\text{Mean MBF} - 1.96 \times \text{SD}$. Thereafter, the samples for which the MBF value exceeded the upper limit of the predictive interval or was below the lower limit of the predictive interval were considered as hyperperfused or hypoperfused, respectively ($p < 0.05$).

A coefficient of variation was calculated for the muscle blood flow to estimate the heterogeneity of the measurements in the contralateral non-injected muscles. It was obtained from the arithmetic mean of the muscle blood flows divided by the standard deviation, and multiplied by 100 to be expressed as a percentage.

Data were analyzed with a general linear model (ANOVA). When a p value lower than 0.05 was observed, ANOVA was followed by adequate post-hoc tests: Dunett's test was used to compare values to a control group, and Fisher's least significant difference test was selected to compare each group to all the others. Data are presented as mean \pm SD unless stated otherwise.

RESULTS

In Vivo Findings

A series of myotonic contractions or intense tremulations were observed in the untreated rabbits, for 10 min after the IM administration of PG, ipsilateral to the IM administration, mainly in the area rear to the injection site. Series of contractions were also seen in all rabbits pretreated with the pharmacological modulators but not in the PAN group.

Electromyographic examinations showed a spatial recruitment of the muscle contractions, which for the first few minutes were clonic and continuous (Fig. 2), then showed a slightly decreased frequency. This pattern was completely abolished by pretreating the rabbits with pancuronium bromide.

Assessment of the Skeletal Muscle Damage

The extent of necrotic damage to the muscle, in the control groups, was not different between the 3 volumes of PG administered. However, the weight of the peripheral red reactive tissue was significantly increased ($p = 0.013$) between the 2 and 3 ml PG IM administrations (8.0 ± 1.3 g and 14.5 ± 4.5 g respectively; Fig. 3). The extent of necrotic damage did not differ significantly between the control group administered with 2 ml of PG (CON2: 2.8 ± 1.1 g) and the groups treated with the pharmacological modulators (PAN, DAN, INDO, and SPA groups: 1.9 ± 0.8 g, 1.8 ± 0.3 g, 1.7 ± 0.8 g, and 1.7 ± 0.2 g, respectively). The extent of the peripheral red reactive tissue in the rabbits treated with DAN (4.9 ± 1.7 g), INDO (4.6 ± 0.6 g), and SPA (3.7 ± 0.5 g) but not with PAN

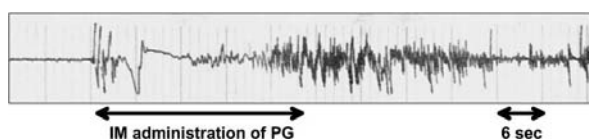


Fig. 2. Representative electromyographic pattern of skeletal muscle contractions observed after the IM administration of 2 ml of propylene glycol in the *longissimus dorsi* muscle of rabbit. This pattern was abolished by pretreatment of the rabbits with pancuronium bromide.

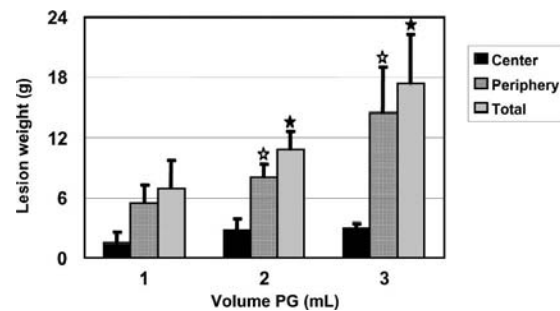


Fig. 3. Weight of the different areas (center, periphery, and total) of damaged muscle 6 h after the IM administration of propylene glycol in the lumbar muscles of the rabbit: effect of the administered volume (1, 2, and 3 ml) (mean \pm SD, bars with stars are statistically different, $n = 12$).

(6.8 ± 2.2 g) was significantly reduced in comparison with CON2 (8.0 ± 1.3 g) ($p = 0.036$, 0.035 and 0.09 , respectively) (Fig. 4).

Microscopic examinations showed a central zone exhibiting dissociation of the muscular cells at 15 min after the IM administration, without extensive degeneration and vascular events, except some sludge or microthrombosis. In the periphery, slight arterial vasodilation, congestion with hyaline plasma, mechanical extravasations, and interstitial edema were observed. At 45 min after the IM administration, larger, rounded myocytes, some of which were hyaline, were clearly dissociated. An arterial sludge and an accumulation of fibrin, red blood cells and leukocytes could be seen in the venules. Vascular congestion and hemorrhages were apparent in the peripheral zone.

At 90 min after the IM administration, the myocytes showed extensive degeneration and necrosis, with focal loss of myofibrillar structure but with intact cell membranes and nuclei. Some venules were dilated and empty. At 3 h after the IM administration, extensive, multifocal fragmentation and hypercontraction of some myocytes were observed, with several hyaline deposits. In the capillaries of the peripheral zone, the heterophilic blood cells were margined and a diapedesis pattern sometimes observed. At 6 h after the IM administration, muscle fibers were dissociated by edema, and exudation was apparent. The muscular tissue was infiltrated by heterophilic blood cells, and thrombosis was observed in large vessels.

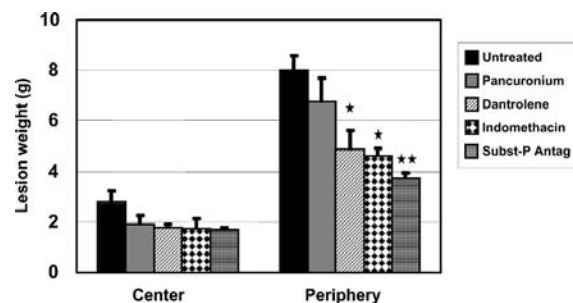


Fig. 4. Effect of different pharmacological modulators on the weights of the different areas (center and periphery) of the damaged muscle 6 h after the IM administration of 2 ml of propylene glycol (mean \pm SEM, significant variation vs. untreated group is $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, $n = 20$).

Changes in the Whole Skeletal Muscle Blood Flow

The total cardiac output at the beginning of the study did not differ between treated and untreated rabbits (102 ± 8.6 ml $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), and was comparable to the previously published values for pentobarbital-anesthetized rabbits [i.e., 92 ml $\text{kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ in resting conditions (11)], thus validating the absolute measurements of the organ blood flows. A slight decrease in the total cardiac output was observed throughout the duration of anesthesia, which was comparable for all groups of treated and untreated rabbits.

Under basal conditions, the mean control MBF assessed before the IM administrations in the LD muscle samples of rabbits from the CON1, CON2, and CON3 groups was 39 ± 6.2 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$, and the control MBF in the quadriceps femoris muscle samples was 44 ± 6.8 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$. No difference between left and right side for the MBF in the LD muscle samples (left: 40 ± 5.1 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$, and right: 37 ± 7.1 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$) and the quadriceps femoris muscle samples (left: 41 ± 3.3 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$, and right: 46 ± 8.1 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$) was evidenced. Moreover, the quadriceps femoris MBF remained stable for the total duration of the experiment, with final values of 49 ± 27.0 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ (left side) and 46 ± 18.6 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ (right side) 6 h after the IM administration.

In the contralateral noninjected muscle, the overall coefficient of variation for the MBF was 34% regardless of the time postinjection (from 0 to 6 h) under anesthesia and regardless of the status of the rabbit (pretreated or not with the pharmacological agents).

A significant increase in the MBF was observed in the injected muscle, compared to the contralateral noninjected muscle, of the CON1, CON2, and CON3 groups for all the volumes of PG at 15 min ($p < 0.05$). The mean increase was 351% (or 98 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$) of the contralateral value in CON3. The maximal value for the whole injected muscle (140 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$, i.e., a 623% increase) was observed in one rabbit in the CON3 group. The increase in MBF reached significance ($p = 0.013$) at 45 min postadministration, in CON1 and at 90 min in the CON1 and CON2 (Fig. 5). The whole MBF had returned to basal level at 6 h after the IM administration (CON1, CON2, and CON3).

The treated rabbits were compared to CON2, in which the observed increase in MBF for the whole injected muscle compared to the noninjected contralateral muscle was +175% at 15 min, +113% at 45 min, and +97% at 90 min. All treatments (PAN, DAN, IND, and SPA) significantly reduced hyperemia at 15, 45, and 90 min ($p < 0.05$), by up to 81% for the

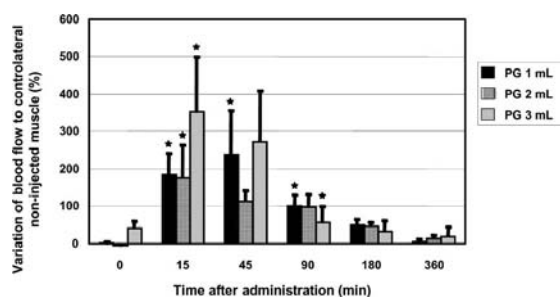


Fig. 5. Whole muscle blood flow evolution after the IM administration of propylene glycol in untreated rabbits: effect of the injected volume of propylene glycol (mean \pm SEM, *significant variation vs. contralateral, $n = 12$).

DAN group at 15 min (Fig. 6). The whole MBF had returned to basal values in all the treated groups at 6 h after the IM administration.

Blood Flow Distribution Within the Skeletal Muscle Lesion

The maximal MBF observed in the individual samples from the injected muscles was 242, 193, and 321 $\mu\text{l min}^{-1} \text{g}^{-1}$ at 15 min in CON1, CON2, and CON3, respectively.

The mean weights of hypo- or hyperperfused muscle were not significantly modified by any of the pretreatments with pharmacological agents.

None of the slices of muscle from the red peripheral area was found to be hypoperfused, in any of the untreated rabbits, regardless of the volume of PG administered, whereas 81% (in weight proportion to the total weight of the area) of slices from this zone of the damage were found to be hyperperfused between 15 min and 3 h after the IM administration. In the central area, in the first 90 min, 0% of the area was found to be hypoperfused in CON1, 27% in CON2, and 48% in CON3. The evolution of blood flow in each of the samples from the injected muscle, compared to the predictive interval determined from the contralateral non-injected muscle values, is shown for a representative rabbit in Fig. 7.

DISCUSSION

This study is the first to report the evolution and distribution of skeletal MBF in a model of local iatrogenic muscle damage. The major findings are that:

1. A very rapid and dramatic increase in the whole blood flow occurs in the injected muscle.
2. The increase in MBF is transient, as all the values had returned to normal levels by 6 h after the IM administration.
3. The central area is mainly hypoperfused and is not modified by any of the pharmacological modulators. The red peripheral area close to the center, which is hyperperfused, is reduced by treatment of the animals with DAN, IND, or SPA, but not with PAN, whereas all four pharmacological modulators reduce the extent of hyperperfusion.

The rabbit model was chosen because of the availability of a large and homogeneous muscle mass in the paravertebral area, allowing adequate muscle samples. Moreover, the rabbit is a key species for testing muscle tolerance of injectable formulations (12) and has been used to document MBF during exercise (11). Propylene glycol, the test article selected here, is known to be poorly tolerated by the skeletal muscle (13,14).

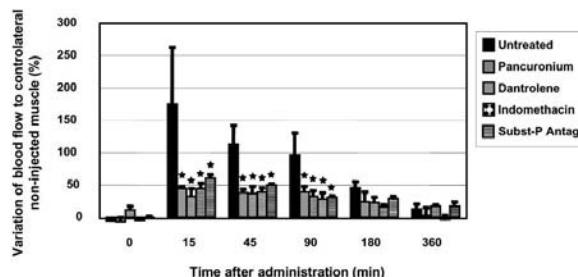


Fig. 6. Whole muscle blood flow evolution after IM administration of 2 ml of propylene glycol: effect of different pharmacological agents (mean \pm SEM, *significant variation vs. untreated group, $n = 20$).

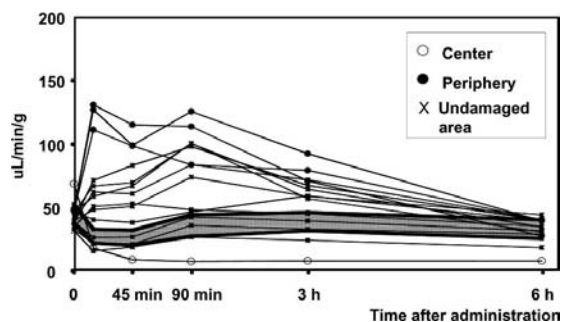


Fig. 7. Representative time course and heterogeneity of the absolute blood flow in muscle pieces from the center, periphery, and normal undamaged area of a rabbit muscle damaged by the IM administration of 2 ml of propylene glycol. The hatched area corresponds to the 95% predictive interval (mean \pm 2 SD) of the blood flow values measured in the noninjected contralateral muscle.

It is used as an organic cosolvent at concentrations up to 100% for an increasing number of pharmaceutical formulations, as in recent years high-throughput biological screening and combinatorial chemistry has produced new, more lipophilic and less water-soluble chemicals (15). By inducing the lesion with a vehicle rather than with a pharmaceutical formulation containing vehicle plus active ingredient, any effects of the active ingredient on the observed mechanism of lesion development could be circumvented.

One limit of our study is that we have not documented the long-term reaction of the muscle tissue. This would require the use of a conscious model with chronic catheterism. Another issue is that an isoflurane-induced hemodynamic effect may interfere with changes in muscle blood flow. Even though the actual absolute values of blood flow may not be representative of those in the awake animal, the blood flow values from the injected muscle were intra-individually compared with the values obtained from the contralateral non-injected muscle at each time of measurement. Another potential limit is also the absence of a control group with saline instead of PG, or a sham-injected group (i.e., a needle inserted in the muscle with no injection of any drug) in order to discriminate precisely between the effects induced by the needle insertion and by the chemical properties of the drug itself. However, as well-tolerated nondamaging formulations such as normal saline are not a concern in clinical settings, the aim of this study was to document only the effects of damaging IM administrations on MBF. Groups receiving different volumes of PG (1, 2, and 3 ml) were included in order to obtain a large range of muscle lesions and to document the possible relationship between extent of muscle damage and change in MBF.

One of the major observations of this study was the spatial coexistence of muscle hypoperfusion and hyperperfusion in the acute phase after an IM administration. In myocardial infarcts or tourniquet-induced muscle ischemia, it is usually the temporal succession of ischemia and reperfusion that is reported and that is responsible for most of the damage (16).

In a study of hind limb muscles in the rabbit, MBF heterogeneity was evaluated at rest and during contractions-induced hyperemia (11). This heterogeneity remained unchanged (coefficient of variation of 31% to 41%) both during the different periods for which blood flow was averaged (from 10 s to 10 min duration) and during the periods of exercise,

despite a major increase during the exercise. Moreover, the microspheres technique was found to be in good agreement with other methods used for the assessment of MBF. In our study, the coefficient of variation calculated for the contralateral non-injected muscles, regardless of the treatment and regardless of the time of assessment, was similar to the values reported by Iversen *et al.* (11) (i.e., between 31% and 41%). The spatial distribution of local blood flow within the rabbit myocardium is also heterogeneous, up to 200% (17). The effect of the injected volume was tested using 1, 2, and 3 ml of PG, but no clear relationship was seen between the volume and the increase in MBF, although the extent of the observed damage was volume-related.

No previous study has investigated the evolution of MBF within postinjection muscle damage. Therefore, several different hypotheses were taken into consideration in the selection of suitable pharmacological modulators for our experiments. The dosages of the different modulators were selected according to previously published data [e.g., pancuronium (18–20), dantrolene (21)] or pharmacokinetic calculation [e.g., indomethacin (22,23)]. The dosage of SR-140333 was determined in a separate pilot study (data not shown) and corresponds to the dose required to antagonize substance-P-induced hypotension.

As reflex muscle contractions were observed after PG administration, we first used a neuromuscular blocking agent, pancuronium bromide, to discriminate between a direct effect of the test article and an indirect effect, due to the contractions. Indeed, contractions result in high intramuscular tensions that can mechanically disrupt the myofibers, or permit phospholipase A₂ to directly lyse the components of the sarcolemma, together with high local temperatures in the muscle that can delete the protein structures (24). It was hypothesized that such contractions were responsible for the observed increase in blood flow due to an increased energy demand during muscular contraction. Indeed, contractions were abolished in the PAN group, and the increase in MBF was reduced but with no significant reduction of muscle damage. This suggests that the contractions were partly responsible for the increase in MBF, but that the increase in blood flow was not related to development of the muscle damage. Regarding the absolute values for blood flow, although some individual values in the areas close to the center of the damage were very high (up to 10-fold higher than the non-injected contralateral muscle or the basal values), the whole MBF had increased only 4.5-fold at 15 min after the IM administration of 3 ml of PG. In comparison, a 16-fold increase in whole blood flow (vs. rest value: $34 \pm 3.3 \mu\text{L min}^{-1} \text{g}^{-1}$) was observed in muscles of rabbits during exercise-induced contraction hyperemia.

The role of intracellular calcium has been studied in strenuous exercise, myocardial ischemia, muscular dystrophies, and injection-induced muscle damage. Muscle damage and creatine kinase release, after PG administration in isolated muscles, were associated with an intracellular mechanism involving the mobilization of calcium rather than direct damage to the sarcolemma (14). The loss of calcium homeostasis in myofibers and more specifically the increase in cytosolic free calcium is a major step in the cascade of events that results in cellular damage after exercise (24). Intracellular calcium has been shown to be an activator of phospholipase A₂ and also of the calcium-dependent proteases (25). The

release of calcium ions from the sarcoplasmic reticulum to the myoplasm is inhibited by dantrolene, which interacts with the ryanodine receptor, a major calcium release channel (26). It reduces creatine kinase release during exercise in the rat (27) and after repetitive blood sampling in the rabbit (28). It also prevents muscle damage in ischemic-reperfused hindlimb in the rabbit (21). In our study, the increase in blood flow to the PG-injected muscle was reduced in the DAN group.

The role of the prostanoids in the evolution of blood flow and in the development of muscle damage was evaluated in our study by using IND, a cyclooxygenase inhibitor for both COX-1 and COX-2 at the selected dosage. COX-2 is induced in the subcutaneous skeletal muscle and local inflammatory cells at the RNA, protein and prostanoid (PGE_2) levels, 3 h after carrageenan-induced inflammation in the rat (29). *In vitro*, well differentiated skeletal muscle cells produce COX activity and PGF_α when they are stretched (30). Prostanoids are known to induce vasodilation of the muscle microcirculation. They are produced during episodes of local hypoxia or increases in blood velocity, which both occur during muscle contractions (31). Moreover, the administration of IND reduces contraction-induced hyperemia by 25% to 50% (32). In our study, inflammation was clearly observed by microscopic examination, and IND was shown to be effective in reducing the PG-induced increase in blood flow and the extent of the muscle damage.

Finally, the IM administration of drugs is most often painful (33) and we hypothesize that neurogenic inflammation might be involved in damage development. When the afferent axons are stimulated, a response by the tachykinins is induced, and substance-P (SP) is transported to the peripheral sensory endings, and released. Intense arterial vasodilation occurs in the tissue, with plasma extravasation and afflux of inflammatory cells. Moreover an axonal reflex produces a temporal and a spatial amplification of the reaction to neighboring endings (34). Although neurogenic inflammation has been described mainly for the eye, skin and intestinal tract, it seems that a neurogenic inflammation can be triggered from the skeletal muscle. Indeed, a colocalized expression of C-fos proteins (an index of pain) and NK_1 receptors in central neurons was evidenced after the IM administration of mustard oil in rat muscle (35). The activity of SP is mediated by the NK_1 tachykinin receptors, for which SR140333 has proven to be a potent nonpeptide antagonist (36). In our study, SR140333 reduced the increase in blood flow after the IM administration of PG in the muscle, in a similar way to the SP induction of arterial vasodilation in the tissues. Another action of SR140333 is to reduce the weight of the muscle damage, probably by limiting the spatial extension of inflammation by the axonal reflex, characteristic of neurogenic inflammation (34). Thus, the neurogenic inflammation process could be one of the pathways involved in the muscle reaction to iatrogenic damage, mainly by increasing the area of the inflamed tissue.

In conclusion, we have demonstrated that a major but transient increase in blood flow occurs within the skeletal muscle during the hours following IM administration of PG. Hyperperfused and hypoperfused areas coexist spatially within the lesion and its surroundings. Transient muscle contractions after the administration are partially responsible for the observed hyperemia but are not involved in the acute development of muscle damage. This seems to be induced by the loss of intracellular calcium homeostasis within the myo-

fibers with a subsequent involvement of the inflammatory syndrome. None of the investigated pathways abolished the muscle damage or reduced the necrotic area, suggesting that direct toxicity of the test article and mechanical disruption of the myofibers are also major factors involved in muscle damage.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Jean-Pierre Gau, Nadine Gautier, and Nathalie Arpaillange for technical assistance.

REFERENCES

1. D. J. Greenblatt and M. D. Allen. Intramuscular injection-site complications. *JAMA* **240**:542–544 (1978).
2. E. V. Alvarez, M. Munters, L. S. Lavine, H. Manes, and J. Waxman. Quadriceps myofibrosis. A complication of intramuscular injections. *J. Bone Joint Surg. Am.* **62**:58–60 (1980).
3. L. Rossi and D. Conen. Die intramuskuläre Injektion—eine überholte Applikation sart? 6 Fälle von *Staphylococcus-aureus*-Sepsis nach intramuskulären Injektionen. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **125**:1477–1482 (1995).
4. W. G. Van Alstine and J. A. Dietrich. Porcine sciatic nerve damage after intramuscular injection. *Comp Contin Educ Pract Vet* **10**:1329–1332 (1988).
5. G. A. Brazeau and H. L. Fung. Physicochemical properties of binary organic cosolvent-water mixtures and their relationships to muscle damage following intramuscular injection. *J. Parenter. Sci. Technol.* **43**:144–149 (1989).
6. P. J. Ferre, D. Concorde, V. Laroute, G. P. Chanoit, J. P. Ferre, M. Manesse, and H. P. Lefebvre. Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep. *Am. J. Vet. Res.* **62**:1698–1705 (2001).
7. Y.-H. Tsai and S.-I. Naito. Simultaneous determination of indomethacin and its metabolites in rabbit plasma by high-pressure liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **8**:203–209 (1981).
8. M. Petty and J. Reid. The cardiovascular effects of centrally administered substance P in the anaesthetised rabbit. *Eur. J. Pharmacol.* **82**:9–14 (1982).
9. M. F. Van Oosterhout, H. M. Willigers, R. S. Reneman, and F. W. Prinzen. Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am. J. Physiol.* **269**:H725–H733 (1995).
10. E. Thein, S. Raab, A. G. Harris, and K. Messmer. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput. Methods Programs Biomed.* **61**:11–21 (2000).
11. P. O. Iversen, M. Standa, and G. Nicolaysen. Marked regional heterogeneity in blood flow within a single skeletal muscle at rest and during exercise hyperaemia in the rabbit. *Acta Physiol. Scand.* **136**:17–28 (1989).
12. S. C. Sutton, L. A. Evans, M. T. Rinaldi, and K. A. Norton. Predicting injection site muscle damage. I: Evaluation of immediate release parenteral formulations in animal models. *Pharm. Res.* **13**:1507–1513 (1996).
13. G. A. Brazeau and H. L. Fung. Use of an in vitro model for the assessment of muscle damage from intramuscular injections: in vitro-in vivo correlation and predictability with mixed solvent systems. *Pharm. Res.* **6**:766–771 (1989).
14. G. A. Brazeau and H. L. Fung. Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J. Pharm. Sci.* **79**:393–397 (1990).
15. F. Mottu, A. Laurent, D. A. Rufenacht, and E. Doelker. Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **54**:456–469 (2000).
16. F. W. Blaisdell. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc. Surg.* **10**: 620–630 (2002).
17. U. Schwanke, A. Deussen, G. Heusch, and J. D. Schipke. Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**:H1029–H1035 (2000).

18. S. Bhattacharya, M. R. Glucksberg, and J. Bhattacharya. Measurement of lung microvascular pressure in the intact anesthetized rabbit by the micropuncture technique. *Circ. Res.* **64**:167–172 (1989).
19. S. V. Hildebrand. Paralytic Agents. In D. F. Kohn, S. K. Wixson, W. J. White, and G. J. Benson (eds.), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, Academic Press, San Diego, CA, 1997, pp. 57–72.
20. G. S. Worthen, R. S. Gumbay, D. T. Tanaka, and M. M. Grunstein. Opposing hemodynamic effects of substance P on pulmonary vasculature in rabbits. *J. Appl. Physiol.* **59**:1098–1103 (1985).
21. L. Klenerman, N. M. Lowe, I. Miller, P. R. Fryer, C. J. Green, and M. J. Jackson. Dantrolene sodium protects against experimental ischemia and reperfusion damage to skeletal muscle. *Acta Orthop. Scand.* **66**:352–358 (1995).
22. A. Rane, O. Oelz, J. C. Frolich, H. W. Seyberth, B. J. Sweetman, J. T. Watson, G. R. Wilkinson, and J. A. Oates. Relation between plasma concentration of indomethacin and its effect on prostaglandin synthesis and platelet aggregation in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **23**:658–668 (1978).
23. F. Fawaz, F. Bonini, M. Guyot, A. M. Lagueny, H. Fessi, and J. P. Devissaguet. Influence of poly(DL-lactide) nanocapsules on the biliary clearance and enterohepatic circulation of indomethacin in the rabbit. *Pharm. Res.* **10**:750–756 (1993).
24. R. B. Armstrong. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* **22**:429–435 (1990).
25. E. Schmidt and F. W. Schmidt. Enzyme release. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **25**:525–540 (1987).
26. K. Paul-Pletzer, S. S. Palnitkar, L. S. Jimenez, H. Morimoto, and J. Parness. The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [3H]azidodantrolene by photoaffinity labeling. *Biochemistry* **40**:531–542 (2001).
27. G. J. Amelink, C. J. Van der Kallen, J. H. Wokke, and P. R. Bar. Dantrolene sodium diminishes exercise-induced muscle damage in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **179**:187–192 (1990).
28. H. P. Lefebvre, J. P. Jaeg, A. G. Rico, P. L. Toutain, and J. P. Braun. Variations of plasma creatine kinase in rabbits following repetitive blood sampling effects of pretreatment with acepromazine, carazolol and dantrolene. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **30**:425–428 (1992).
29. F. Nantel, D. Denis, R. Gordon, A. Northey, M. Cirino, K. M. Metters, and C. C. Chan. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **128**:853–859 (1999).
30. H. H. Vandemburgh, J. Shansky, R. Solerssi, and J. Chromiak. Mechanical stimulation of skeletal muscle increases prostaglandin F2 alpha production, cyclooxygenase activity, and cell growth by a pertussis toxin sensitive mechanism. *J. Cell. Physiol.* **163**:285–294 (1995).
31. J. M. Lash. Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**:218–235 (1996).
32. A. Kilbom and A. Wennmalm. Endogenous prostaglandins as local regulators of blood flow in man: effect of indomethacin on reactive and functional hyperaemia. *J. Physiol.* **257**:109–121 (1976).
33. G. A. Brazeau, B. Cooper, K. A. Svetic, C. L. Smith, and P. Gupta. Current perspectives on pain upon injection of drugs. *J. Pharm. Sci.* **87**:667–677 (1998).
34. D. G. Payan. The role of neuropeptides in inflammation. In J. I. Gallin, I. M. Goldstein, and R. Snyderman (eds.), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, Ltd., New York, 1992, pp. 177–192.
35. C. A. Doyle and S. P. Hunt. Substance P receptor (neurokinin-1)-expressing neurons in lamina I of the spinal cord encode for the intensity of noxious stimulation: a c-Fos study in rat. *Neuroscience* **89**:17–28 (1999).
36. X. Emonds-Alt, J. D. Doutremepuich, M. Heaulme, G. Neliat, V. Santucci, R. Steinberg, P. Vilain, D. Bichon, J. P. Ducoux, and V. Proietto. In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **250**:403–413 (1993).

C. Etude du transcriptome musculaire (Article 5)

Problématique : La physiopathologie des lésions musculaires iatrogènes semble être polyfactorielle comme cela a été mis en évidence précédemment par l'étude des débits sanguins locaux (prostanoïdes inflammatoires, inflammation neurogénique et calcium intracellulaire). Les méthodes récentes de criblage de l'expression des gènes peuvent permettre d'appréhender une grande partie des voies réactionnelles impliquées.

Objectifs : Décrire et de comprendre la dynamique temporelle des lésions du muscle à travers les variations d'expression des gènes lors du développement et de la régénération d'une lésion musculaire iatrogène.

Matériels et méthodes : Des lésions ont été induites chez 10 porcelets par 4 administrations IM successives de 4 mL de PG dans les muscles *Longissimus dorsi*, représentant 4 stades d'évolution lésionnelle : 6 h, 2, 7 et 21 jours après administration, représentant l'inflammation aiguë et la régénération progressive du tissu. Le muscle non administré a été utilisé comme témoin. Le schéma expérimental d'administration aux animaux est présenté en figure 20.

Hybridation : Après broyage des muscles dans l'azote liquide avec un appareil à billes d'acier inoxydable, les ARN totaux ont été extraits. Pour chaque échantillon, un aliquot de 5 µg d'ARN total a été soumis à une transcription inverse avec incorporation de dCT α ³³P pour former de l'ADN complémentaire marqué (ADNc, cibles complexes).

L'ADNc a été ensuite hybridé sur des microréseaux nylon à ADN. Les 3456 séquences présentes sur les microréseaux représentaient au moins 1908 gènes identifiés, et étaient issues de deux banques porcines normalisées d'ADNc : une banque multi-tissus pour 1056 séquences (AGENAE : Analyse des GENomes d'Animaux d'Elevage, INRA, France, <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/adena/> et/ou SIGENAE : Système d'Information du projet d'Analyse des GENome d'Animaux d'Elevage, http://sigena.jouy.inra.fr/new_site/) et une banque musculaire pour 2208 séquences (Bendixen C et al, données non publiées, The Department of Food Sciences, Danish Institute of Agricultural Sciences, Tjele, Denmark).

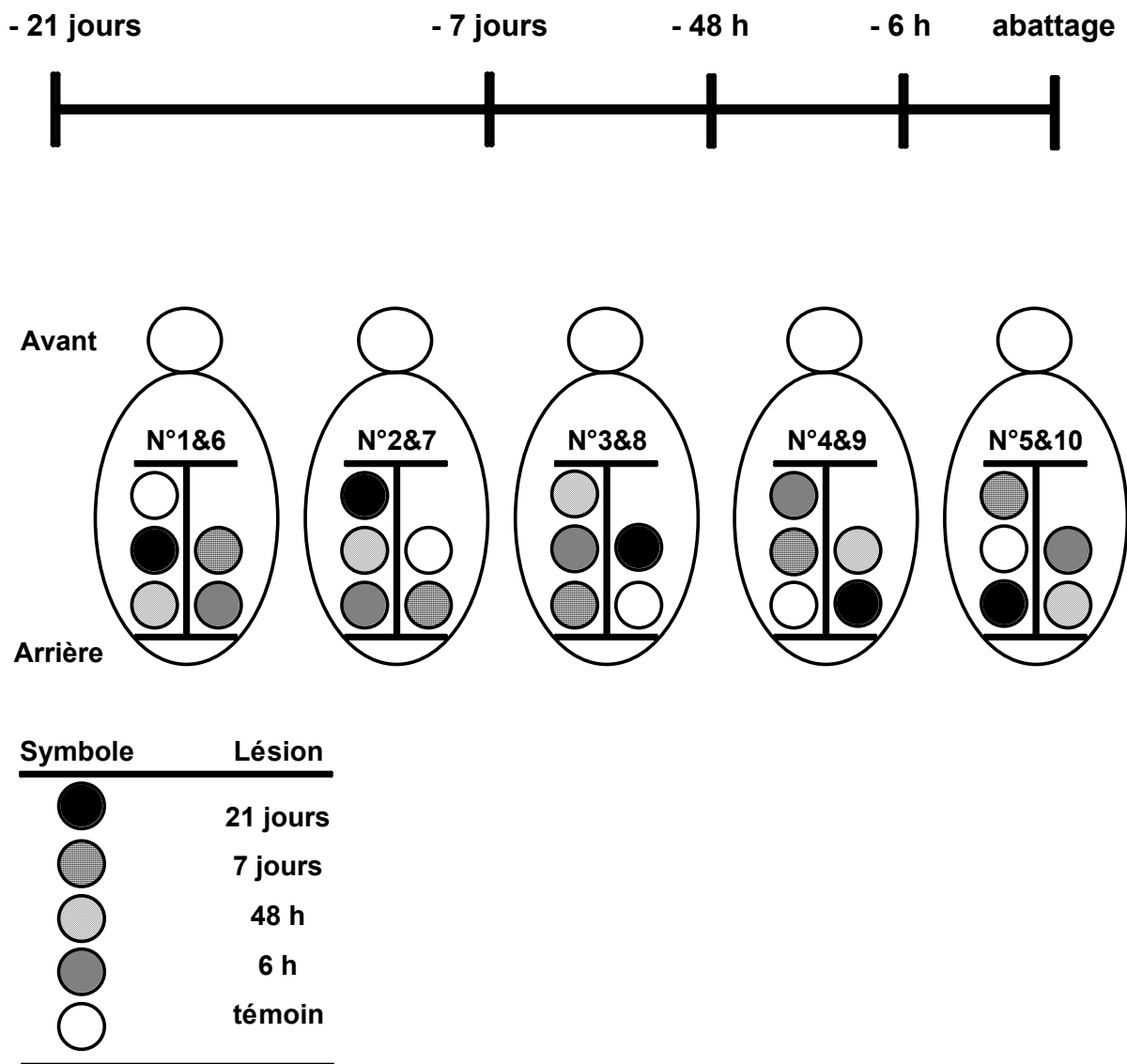


Figure 20 – Schéma expérimental : Répartition des sites d'injection IM dans la masse lombaire de 10 porcelets (numérotés de 1 à 10). Chaque porcelet a reçu une injection IM de 4 mL de propylène glycol 21, 7 jours, 48 et 6 heures avant l'abattage.

Les microréseaux ont d'abord été hybridé avec une cible oligonucléotidique (cible vecteur) complémentaire d'une séquence d'ADN unique (celle du vecteur ayant été utilisé pour la construction des banques d'ADN). Cette séquence vecteur étant présente dans chacune des 3456 séquences sondes, cette étape a permis d'évaluer la qualité des microréseaux et éventuellement de normaliser l'ensemble des signaux obtenus avec les ADNc des échantillons expérimentaux.

Analyse des microréseaux : Après exposition des microréseaux à un écran sensible au phosho et lecture du signal par un phoshoimageur, les images obtenues ont été analysées par un logiciel dédié aux microréseaux nylon et au marquage des cibles en radioactivité. Il s'agissait d'adapter une grille d'analyse aux schéma de dépôt des 3456 séquences sur les microréseaux, et de circonscrire et mesurer l'intensité des pixels de chaque dépôt le plus finement possible. Plusieurs logiciels ont été testé, et la solution semi-automatisée offerte par le logiciel BZScan a été retenue (BZScan, TAGC, INSERM-ERM 206, Parc scientifique de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France) (Lopez *et al.*, 2004). Plusieurs méthodes d'analyse étaient proposées par le logiciel, avec prise en compte du bruit de fond local, de la surexposition de quelques dépôts, l'ajustement automatique des diamètres de la grille au diamètre exact de chaque dépôt, etc..., mais c'est finalement la solution de mesure la plus directe, sans correction, qui a entraîné les meilleures valeurs de coefficients de variation entre les répliques (<20 %).

Le logarithme des signaux d'hybridation des cibles complexes a été calculé et normalisé par la médiane des signaux de chaque microréseau. Les comparaisons de l'expression des gènes entre les 4 conditions pathologiques et le témoin ont été réalisées pour chacun des 10 animaux en calculant le ratio d'expression entre 2 conditions consécutives (muscle témoin vs lésion à 6 h, lésion à 6 h vs lésion à 2 jours, lésion à 2 jours vs lésion à 7 jours, et enfin lésion à 7 jours vs lésion à 21 jours). Entre 2 conditions, un test de *t* de Student a été appliqué en données appariées, et seuls les ratios d'expression au moins égaux à 1,5 ont été considérés. Chaque gène étant observé à 5 stades différents, 4 ratio successifs ont été calculés, chacun avec 3 variations d'expression possibles : 1/ pas de différence d'expression, 2/ augmentation d'expression et 3/ diminution d'expression. Pour classer chaque gène, 81 profils d'expression au cours du temps étaient possibles au total (3^4 : 4 comparaisons temporelles et 3 possibilités de variation pour chacune).

Résultats : Les résultats montrent que seulement 15 profils d'expression sont représentés parmi les 81 profils théoriques possibles. La majorité des séquences présentes sur le microréseau a montré une expression constante au cours du temps. Au total, 187 des 1908 gènes connus ont eu une expression variable à au moins un des stades de lésion musculaire. Parmi les 187 gènes sélectionnés, certains étant représentés plusieurs fois, il restait 131 gènes différents à expression variable. Les variations étaient les plus nombreuses dans les premiers stades lésionnels (entre muscle témoin et 6 h, puis entre 6 h et 2 jours).

Article 5 :

Gene expression profiling in skeletal muscle after the intramuscular administration of a pharmaceutical vehicle.

Ferré PJ, Concordet DC, San-Cristobal M, Tosser-Klopp G, Bonnet A, Toutain PL, Hatey F, Lefebvre HP and Liaubet L

Rédaction en cours

Gene expression profiling in skeletal muscle after the intramuscular administration of a pharmaceutical vehicle

Pierre J Ferré¹, Didier Concordet¹, Magali San-Cristobal², Gwenola Tosser-Klopp²,
Agnès Bonnet², Pierre-Louis Toutain¹, François Hatey², Hervé P Lefebvre¹ and
Laurence Liaubet²

¹UMR 181 Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales INRA-ENVT, Ecole
Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex
03, France

²UR 444 Génétique Cellulaire INRA, chemin de Borde Rouge – Auzeville, BP 27,
31326 Castanet-Tolosan cedex, France

Running title:

Skeletal muscle gene profile changes after IM administration

Introduction

The intramuscular (IM) route is widely used for drug administration. It was formerly estimated that more than half a million IM administrations were performed daily within the US (1). It was also observed by the Boston Collaborative Drug Surveillance Program that 46 % of patients received at least one IM administration during hospitalization. Currently, the increasing interest in the therapeutic use of peptides, proteins or gene delivery for which the oral route is not possible, makes the development of IM formulations pivotal (2). However, despite many advantages, the IM administrations often induce skeletal muscle damage and patient discomfort or pain. Adverse events were observed after 0.4 % of the total number of IM administrations performed (3). More recently, a survey showed that 23 % of 639 pediatric nurses had observed serious complications after IM administrations they had performed (4). The IM administration is mainly associated with pain, swelling, redness and movement discomfort. There are also chronic consequences with local fibrosis of the muscles leading to muscle contractures (5, 6). Abscesses (7) or *Staphylococcus aureus* sepsis (8) have also been described. An emerging medical pathology, macrophagic myofasciitis, has been recently described (9) and associated with the IM administration of vaccinal drugs (10).

During the development process of a drug formulation for IM use, local tolerance testing is performed in laboratory animals. The injection sites are currently observed at different time intervals after the IM administration, using basic macro and microscopic pathological examinations. The pathological examinations mainly represent a rough evaluation of the extent and severity of the muscle lesions in connection with the drug, the vehicle, the pH or the injected volume and concentration, but little information about the pathophysiological pathways is drawn from those studies. The skeletal muscle lesions usually consist of a sequence of cellular events: First, there is a phase of degeneration of the damaged myofibers and phagocytosis through the invading inflammatory cells. Subsequently, a phase of regeneration of the muscle organization involves the preserved satellite cells or myoblasts that proliferate, differentiate and merge into adult myocytes (11, 12). Although histological studies are useful in the documentation of the actual muscle tolerance to the various formulations under development, they are only descriptive of the cellular events occurring in the muscle. Further documenting the development of the drug-induced muscle lesions at the molecular level would probably help in the

understanding of the reactions and help in the development of new well-tolerated formulations.

The aim of the present study was to describe the gene expression profiles in the muscle at different time intervals of the post-injury process after an IM administration in a non-rodent animal model, the pig. Propylene glycol, an organic co-solvent that is used in many drug formulations, and known for its poor local tolerability, was chosen as a test-article to induce the muscle lesions. A series of 4 IM administrations was performed in the *Longissimus dorsi* muscles in piglets to obtain lesions at 5 different stages covering the time period of the muscle degeneration and regeneration processes. Gene expression profiling was studied using cDNA microarrays.

Materials and Methods

Animals and husbandry- Ten commercial crossbred male piglets (ranging from 23 to 32 kg body weight at the onset of the acclimatization period) were used. They were acclimated to the experimental conditions for two weeks.

The animals were kept at the National Veterinary School of Toulouse, in facilities that are approved by the French Ministry of Agriculture in accordance with the current guidelines for animal care and use. They were provided with conventional starch for piglet and tap water *ad libitum*. They were subjected to daily observation throughout the experimental phase.

Experimental design and IM administration- Propylene Glycol (PG) or 1,2-Propanediol of analytical grade was purchased from Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France. The lumbar area of the animals was thoroughly shaved. A volume of 4 mL of PG was injected aseptically in a standardized manner using a 25 mm-long and 23-Gauge needle inserted perpendicularly to the lumbar area into the middle of the left or right *Longissimus dorsi* (LD) muscle. Each animal received a series of 4 IM administrations of PG randomly distributed into 5 sites from the left and right LD muscles at different time-intervals in order to obtain muscle lesions at different stages. Based on previous experiments with PG (data not shown), the stages selected for covering the acute inflammatory phase and the muscle degeneration and regeneration process were 6 h, 2, 7 and 21 days after the IM administration. The additional fifth site did not receive any IM administration and was used as a control non-injected muscle.

Muscle samples- After euthanasia by an overdose of pentobarbital (Dolethal, Vétoquinol, Lure, France), samples from the muscle lesions and from the control sites were quickly excised in a standardized way, roughly cut and immediately frozen in liquid nitrogen. The samples were then stored at -80°C until analysed.

Total RNA isolation- Total RNA was isolated from each of the 50 muscle samples obtained (5 injection sites per animal). Briefly, the muscle samples were disrupted, homogenized and grinded to a fine powder by rapid agitation for less than one minute in a liquid-nitrogen cooled mixer with stainless steel beads. An aliquot of 250 to 300 mg of the fine powder was then processed through a total RNA isolation and purification method according to the manufacturers' instructions (RNeasy[®] Fibrous Tissue Midi kit from Qiagen SA France, 3 avenue du Canada, LP 809, 91974 Courtaboeuf cedex, France). The method included a proteinase K digestion step to remove proteins and a DNase digestion step to remove contaminating DNA. The extracted total RNA were eluted in 300 μL of Rnase-free water and stored at -80°C . The RNA quality and concentration were controlled using a RNA bioanalyzer (2100 Bioanalyzer – RNA solutions and RNA 6000 Nano LabChip Kit from Agilent Technologies France, 1 rue Galvani, 91745 Massy cedex, France).

cDNA arrays design- Gene expression was analyzed by hybridization of nylon cDNA microarrays with radioactive probes. A set of 3456 porcine cDNA clone inserts representing more than 1908 porcine gene transcripts were spotted as PCR products at high density on nylon microarrays (18x72 mm, Immobilon-Ny+, Millipore, Bedford, MA); all cDNA arrays design and hybridization protocols followed the TAGC laboratory instructions (http://tagc.univ-mrs.fr/oncogenomics/Nylon_microarrays.php) They were spotted twice with a Microgrid II fitted with a 32 pins microarray tool. Clones were selected from two porcine cDNA libraries. 1056 cDNA clones provided from a multi-tissue porcine cDNA library (AGENAE, Analyse des GENomes d'Animaux d'Elevage, INRA, France, <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/adena/> et/ou SIGENAE, Système d'Information du projet d'Analyse des GENome d'Animaux d'Elevage, http://sigena.jouy.inra.fr/new_site/ Tosser-Klopp G et al., unpublished data). 2208 cDNA clones provided from a muscle specific cDNA normalized library (Bendixen C *et al*, unpublished data, The Department of Food Sciences, Danish Institute of Agricultural Sciences, Tjele, Denmark). 192 cDNA clones consisted in control clones and some known interesting genes for muscle and reproductive

physiology. All cDNA clones were amplified in 100 µl 96-well microtiter plates using vector (derived from pT3T7)-PCR amplification with universal M13 primers according to the TAGC laboratory recommendations. The cycling conditions (40 cycles) were as follows: 30 sec of denaturing at 94°C, 40 sec of annealing at 60°C and 2 min of elongation at 72°C. The presence of the amplified product was assessed by agarose (1 %) gel electrophoresis and ethidium bromide staining with about 90% success, and 91 % of the PCR products have been shown to have a size of 200-500 bp. After spotting, the cDNA were fixed on filters by UV cross-linking after alkalin denaturation.

Hybridization of cDNA arrays- cDNA arrays were hybridized twice, first with a vector oligonucleotide labeled with $\sim^{33}\text{P}$ -ATP at 42°C during 12 h to determine the characteristics of the spotting process. After washing, the arrays were positioned into radioisotopic-sensitive imaging plates (FUJIFILM BAS 2025 IP Cassette, Fujifilm, Raytest France S.A.R.L., France). The imaging plates were scanned thereafter with a phosphor imaging system at a 25 µm resolution (FUJIFILM BAS-5000, Raytest France S.A.R.L., France). After stripping, the arrays were then hybridized with a complex target. Briefly, cDNA was synthesized from 5 µg total RNA by simultaneous reverse transcription on mRNA using SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen SARL BP 96, 95613 Cergy Pontoise Cedex) and \sim µCi of $\alpha^{33}\text{P}$ labeled dCTP (specific activity > 3000 Ci mmole⁻¹, Perkin Elmer). Each muscle sample mRNA was hybridized at 68°C during 24 h on an individual array splitted in two duplicated parts.

Analysis of cDNA arrays- Hybridization images from vector and complex targets have been quantified using a semi-automated software (BZScan, TAGC, INSERM-ERM 206, Parc scientifique de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France) (13). A fixed circle segmentation, *i.e.* a gridding process with a fixed spot diameter was applied. The gridding obtained with vector hybridization images was used to assess the reproducibility of the quantification signals between array replicates. This gridding was also used to generate an initial gridding for the analysis of the complex target hybridization images. The complex hybridization images were quantified by the extraction of the intensity for each spot.

Statistics- Data from BZScan output were logarithmically transformed and a global coefficient of variation between all duplicate signals from vector and complex hybridization was calculated.

Normalization between arrays was obtained by dividing each spot measurement by the median value of each array.

The experimental design allowed us to perform 5 repeated measurements on the same animals at different time intervals after the IM administration. The analysis aimed at describing the time-profile evolution of the expression level of each mRNA contained in the muscle. Differences in the quantified hybridization signals for each spot were calculated for each animal between the 5 consecutive time conditions. Mean and standard deviation values for all the animals were computed for each spot. Two consecutive time conditions were compared for each spot by a paired-data Student's *t*-test at a significance level set at 0.0125, *i.e.* a global significance level of 0.05 for each gene (0.0125×4). Among the highlighted significant differences, a 1.5-fold variation was the minimum arbitrarily considered for an increased or a decreased expression level between two consecutive time-conditions. We *a priori* defined all the possible patterns of gene expression over the 5 times of observation, based on the possibility for each gene expression to be increased, decreased or not modified between 2 consecutive time-conditions.

Using the results of the paired comparisons, each gene was classified in one of the 81 possible patterns of expression profile, *i.e.* 4 inter-time comparisons and 3 possibilities of variation of the gene expression.

Data are presented as mean \pm sd unless stated otherwise.

The experimental design, its implementation and the handling of data comply with MIAME standards (14).

Results

Analysis of the spot replicates- The mean global coefficients of variation for spot duplicates between all the hybridization images obtained were 19.5 % and 18.9 % for the vector and complex targets respectively.

Analysis of the patterns of gene expression- Out of a total number of 1908 known genes spotted on the arrays, 187 genes were shown to have a modified expression

at least at one of the 5 time intervals investigated after the IM administration. The remaining genes were not significantly modified during any of the consecutive time-intervals. After close examination of the 187 genes, some were found to be replicated at twice or more with different cDNA sequences on the microarray, and were considered redondant. After removing of the redondant genes, differential expression, *i.e.* under- or overexpression was observed in a total of 131 different genes. Among them, the expression of 64 genes was modified within 6 h after the IM administration, for 47 genes between 6 and 48 h, for 17 genes between 48 h and 7 days, and for 3 genes between 7 and 21 days.

The different patterns of the gene expression time profiles are presented in table 1 and in table 2. For each pattern, the genes are grouped in the table according to their main biological functions, mainly metabolism, structure, signal transduction, transcription, protein synthesis, proteolysis, inflammation, cellular proliferation.

When gradually strengthening the threshold for significance of Student's *t*-tests and while increasing the ratio for the differential expression level between consecutive time-interval, less and less genes were found to be differentially expressed. Increasing the ratio at 2 with a threshold of 1.25% and 0.5% reduced the number of differentially expressed genes to 36 and 23 respectively. At the opposite, without taking any ratio into account, the number of differentially expressed genes was 324 and 157 at a threshold for significance of 1.25% and 0.5% respectively.

Discussion

The effects of the IM administrations of drugs have been mainly documented in conjunction with the administration procedures or with the chemical and physical properties of the drugs administered. Apart from the data of histological analysis in tolerance studies that are required for the registration of medicinal products, little is known about the mechanisms involved in the iatrogenic muscle damage. To our knowledge, this study is the first to report the evolution of the expression of thousands genes with a high throughput method in a model of local iatrogenic skeletal muscle damage. The expression level of 1908 genes was investigated in the

same piglets at 5 time-intervals after the IM administration of PG, leading to some major findings:

1. A total of 14 different patterns of gene expression over time are described
2. The modifications of the muscle transcriptome occur mostly within the first 48 h after induction of the damage
3. An overall decrease in the expression of genes involved in muscle contractile filaments and in mitochondrial or general metabolisms is observed
4. The expression of genes coding for the ribosomal proteins is increased between 6 and 48 h after induction of the damage

The pig was chosen here as a large animal model for the transcriptome analysis because of the availability of a homogeneous muscle (*Longissimus dorsi*) in the paravertebral area, allowing several independent IM administrations to be performed at different stages within the same animal. Moreover, the pig is known for its sensitivity for post-injection muscle damage. Our selection of Propylene Glycol as an irritant test article was done in line with previous studies where it was shown to be poorly tolerated by the skeletal muscle (15, 16). As more lipophilic and less water-soluble chemicals have been recently produced by biological screening and combinatorial chemistry, organic co-solvents are more and more used in pharmaceutical formulations (17). In our experimental model, the use of a vehicle alone to induce the lesion instead of a drug formulation allowed us to avoid any pharmacological effects related to an active ingredient.

No attempt was made in this study to evaluating the actual level of gene expression but only their variation between consecutive time-intervals. The results provided by our approach represent a way of classifying genes into categories of comparable time-profile evolution. This approach is close to the unsupervised clustering methods that are conducted without statistical testing often leading to difficult interpretations. As mentioned in several papers, the setting of a cut-off for significance of differential expression is tricky to manage when dealing with large gene expression experiments (18). Introducing a theoretical Bonferroni-like correction for multiple-hypothesis-testing problem to control the number of false positive genes would have been too stringent in limiting the discovery of differentially expressed genes, as seen elsewhere (18). We have therefore included very homogeneous animals to be

replicated in the experimental design and to limit the biological inter-individual variability. Indeed, the paired comparison of the gene expression between two consecutive stages of muscle damage were made intra-individually, the inter-individual differences among the 10 piglets being the only major source of variability introduced here. The threshold for significance in comparisons being considered as a kind of variable sieving mesh, we provided the list of the genes found differentially expressed for two significance levels (0.5 and 1.25 %). To our knowledge, the possibility to assess in the same animal a gene profiling expression over time is described for the first time.

Gene expression data obtained here can be qualitatively analyzed in conjunction with previous results on muscle degeneration and regeneration (11, 12, 19). The skeletal muscle is one of the few tissues of the body that can regenerate following injury due to a regulated balance of growth, fusion, and differentiation of muscle precursor cells (myoblasts). Schematically, in a mechanically-induced muscle lesion in the rat, activated polynuclear inflammatory cells invade the damaged area during the first 12 h and are followed by macrophages that remove the remaining necrotized fibers within 2 days. Fibroblasts synthetise connective tissue while satellite cells become activated into myoblasts within the basal laminina. At day 7, the regenerating myoblasts have fusionned into myotubes, and at day 21, a scar with new myofibers and connective tissue has been formed (19).

It appears from our study that the muscle degeneration involves intracellular proteolysis, and starts early with the increased expression of BCL2-associated athanogene and carboxypeptidase D (at 6 h) followed at 48 h by the induction of calpain and legumain (protease cystein) transcripts. Together with the proteolysis, the transcription of genes encoding for the main structural and contractile muscle proteins (myosin, actin, troponin, actinin, tropomyosin...) as well as for the cellular and mitochondrial metabolism proteins was repressed. It could be interpreted as a reduction of the muscle demand in energy for contractile activities, since there is first a degeneration period after the onset of the damage. The gene for creatine kinase M, a specific muscular enzyme which is released in plasma when muscle cells suffer, and which is used as an index of muscle damage (20, 21) was downregulated. The regeneration of the muscle usually starts rapidly, since the macrophages have phagocytosed the necrotic muscle fibers within 2 days (19). Thus,

an up-regulation of the genes encoding for the different ribosomal subunits was shown as soon as 48 h after the IM administration, resulting probably from the activation of the quiescent satellite cells, and preceding the onset of the protein synthesis that would occur later on during the regeneration process. The fibroblasts seem to be also involved in the formation of a scar at the injection site, since an increased transcription of different collagen subunits has been shown from 48 h. The tensin protein, whose gene is activated from 6 h after damage, was shown to be involved in muscle regeneration, as the regeneration process in KO mice was delayed about 2-fold (22). Desmin and vimentin are intermediate filament proteins. Desmin is muscle-specific and expressed in proliferating myoblasts as soon as 12 h after muscle injury and increased later on, and is used as an index of skeletal muscle regeneration (22, 23). Vimentin is also expressed uniformly in regenerating myofibers, but also in macrophages, fibrocytes and mononucleated cells, and is therefore used to locate fibrosis (24). The expression of both desmin and vimentin genes is increased at 48 h, which is coherent with an early muscular regeneration.

In our study, several genes are induced during the acute inflammatory response to injury, within the first 2 days. Thus, some cyclophilin genes known for their pro-inflammatory activity (25) are induced at 6 h (PPIA) and at 48 h (PPIB). PPIA is secreted by macrophages or by vascular smooth muscle cells in response to oxidative stress, and elicits a rapid influx of neutrophils, while PPIB was shown to enhance platelet adhesion to collagen. Their function is the folding of protein with a *cis-trans* isomerase activity of peptidyl-prolyl bonds. In the folding pathway, they co-operate as molecular chaperones with heat shock proteins. Accordingly, HSP70-1 and HSP90-like proteins are activated from 6 h and 48 h respectively in our experiment.

In the skeletal muscle, the transcriptional analysis of gene expression has been investigated during exercise (26), acute freezing injury (27), ontogenesis (28) and between different metabolism profiles in mice (29) and pig (30). However, some of the differential genes expressions observed in this study have been described previously in a proteomic analysis on activated human neutrophils for lactoferrin, vimentin, enolase and glyceraldehyde 3- phosphate deshydrogenase genes (31). A

SAGE study in human monocytes and macrophages has also shown differential expression for some genes involved in the immune/inflammatory response (32).

Lactotransferrin and ferritin genes are upregulated respectively from 6 and 48 h. The ferritin H (heavy chain) was shown previously to be induced in human muscle cells by Interleukin 1 (IL-1) which plays a prominent role in the response to inflammation and injury (33). Iron is an essential nutrient involved in immune system, muscle function and metabolism (34). Through the catalysis of free radical production, iron is also a potential toxicant to cells. The increased expression of lactotransferrin and ferritin could regulate iron homeostasis within the muscle damage.

Four genes beginning to be more expressed within the first 48 h, namely IKBL (inhibitor of kappaB-like protein 1, from 6 h), BAT1 (HLA-B associated transcript 1, from 48 h), beta 4-thymosine (from 48 h), and legumain (from 48h) exhibit anti-inflammatory activities. BAT1 antisense assay showed a down-regulation of the acute phase cytokine production (35). IKBL proteins bind to and maintain NFkB (nuclear factor kappaB) in an inactive state in the cytoplasm (36). NFkB is a major transcription factor with a complex regulation that has been shown to be activated in response to oxidative stress and to cytokines and ROS during reperfusion after an ischemic injury in skeletal muscle (37 26). Lille *et al.* demonstrated that the activity of NFkB participated in the neutrophil-mediated oxidant damage and in the expression of cytokines and of the major histocompatibility complex genes (37).

In conclusion, gene profiling in porcine skeletal muscle after IM administration of a test formulation may be useful to investigate pathophysiology of local post-injection muscle damage and potentially for screening test formulations during drug development.

Acknowledgements

Jean-Pierre Gau, Nadine Gautier, Cécile Tonon and the staff of Toulouse Genomic center (Genopole CRGS platform), Francis Benne, Janine Rallièrre, Rémi Houlgatte and the staff of Sigena.

References

1. L. F. Hill. Complication resulting from an intramuscular injection. *J Pediatr* **70**: 1012-3 (1967).
2. G. A. Brazeau, B. Cooper, K. A. Svetic, C. L. Smith, and P. Gupta. Current perspectives on pain upon injection of drugs. *J Pharm Sci* **87**: 667-77 (1998).
3. D. J. Greenblatt and M. D. Allen. Intramuscular injection-site complications. *J Am Med Assoc* **240**: 542-4 (1978).
4. P. C. Beecroft and S. Redick. Possible complications of intramuscular injections on the pediatric unit. *Pediatr Nurs* **15**: 333-6, 376 (1989).
5. E. V. Alvarez, M. Munters, L. S. Lavine, H. Manes, and J. Waxman. Quadriceps myofibrosis. A complication of intramuscular injections. *J Bone Joint Surg Am* **62**: 58-60 (1980).
6. S. S. Babhulkar. Triceps contracture caused by injections. A report of 11 cases. *J Bone Joint Surg Br* **67**: 94-6 (1985).
7. P. S. Bergeson, S. A. Singer, and A. M. Kaplan. Intramuscular injections in children. *Pediatrics* **70**: 944-8 (1982).
8. L. Rossi and D. Conen. [Intramuscular injections--an outdated form of administration? 6 cases of Staphylococcus aureus sepsis following intramuscular injections]. *Schweiz Med Wochenschr* **125**: 1477-82 (1995).
9. R. K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, F. J. Authier, P. Laforet, L. Belec, D. Figarella-Branger, J. M. Mussini, J. F. Pellissier, and M. Fardeau. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. Groupe d'Etudes et Recherche sur les Maladies Musculaires Acquises et Dysimmunitaires (GERMMAD) de l'Association Francaise contre les Myopathies (AFM). *Lancet* **352**: 347-52 (1998).
10. R. K. Gherardi, M. Coquet, P. Cherin, L. Belec, P. Moretto, P. A. Dreyfus, J. F. Pellissier, P. Chariot, and F. J. Authier. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* **124**: 1821-31 (2001).
11. M. D. Grounds. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* **187**: 1-22 (1991).
12. J. G. Tidball. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* **27**: 1022-32 (1995).

13. F. Lopez, J. Rougemont, B. Loriod, A. Bourgeois, L. Loi, F. Bertucci, P. Hingamp, R. Houlgatte, and S. Granjeaud. Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics* **5**: 38 (2004).
14. A. Brazma, P. Hingamp, J. Quackenbush, G. Sherlock, P. Spellman, C. Stoeckert, J. Aach, W. Ansorge, C. A. Ball, H. C. Causton, T. Gaasterland, P. Glenisson, F. C. Holstege, I. F. Kim, V. Markowitz, J. C. Matese, H. Parkinson, A. Robinson, U. Sarkans, S. Schulze-Kremer, J. Stewart, R. Taylor, J. Vilo, and M. Vingron. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**: 365-71 (2001).
15. G. A. Brazeau and H. L. Fung. Use of an in vitro model for the assessment of muscle damage from intramuscular injections: in vitro-in vivo correlation and predictability with mixed solvent systems. *Pharm Res* **6**: 766-71 (1989).
16. G. A. Brazeau and H. L. Fung. Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J Pharm Sci* **79**: 393-7 (1990).
17. F. Mottu, A. Laurent, D. A. Rufenacht, and E. Doelker. Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA J Pharm Sci Technol* **54**: 456-69 (2000).
18. Y. F. Leung and D. Cavalieri. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends in Genetics* **19**: 649-659 (2003).
19. T. Hurme, H. Kalimo, M. Lehto, and M. Jarvinen. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* **23**: 801-10 (1991).
20. H. P. Lefebvre, V. Laroute, J. P. Braun, V. Lassourd, and P. L. Toutain. Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release. *Vet Res* **27**: 343-61 (1996).
21. P. J. Ferre, D. Concordet, V. Laroute, G. P. Chanoit, J. P. Ferre, M. Manesse, and H. P. Lefebvre. Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep. *Am J Vet Res* **62**: 1698-705 (2001).
22. A. Ishii and S. H. Lo. A role of tensin in skeletal-muscle regeneration. *Biochem J* **356**: 737-45 (2001).
23. J. Rantanen, T. Hurme, R. Lukka, J. Heino, and H. Kalimo. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal

muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* **72**: 341-7 (1995).

24. C. Kasemkijwattana, J. Menetrey, G. Somogyl, M. S. Moreland, F. H. Fu, B. Buranapanitkit, S. C. Watkins, and J. Huard. Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant* **7**: 585-98 (1998).

25. L. Andreeva, R. Heads, and C. J. Green. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol* **80**: 305-15 (1999).

26. Y. W. Chen, G. A. Nader, K. R. Baar, M. J. Fredele, E. P. Hoffman, and K. A. Esser. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol* **545**: 27-41 (2002).

27. M. Summan, M. McKinstry, G. L. Warren, T. Hulderman, D. Mishra, K. Brumbaugh, M. I. Luster, and P. P. Simeonova. Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis. *J Interferon Cytokine Res* **23**: 237-45 (2003).

28. K. Sudre, C. Leroux, G. Pietu, I. Cassar-Malek, E. Petit, A. Listrat, C. Auffray, B. Picard, P. Martin, and J. F. Hocquette. Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. *J Biochem (Tokyo)* **133**: 745-56 (2003).

29. W. G. Campbell, S. E. Gordon, C. J. Carlson, J. S. Pattison, M. T. Hamilton, and F. W. Booth. Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C763-8 (2001).

30. Q. Bai, C. McGillivray, N. da Costa, S. Dornan, G. Evans, M. J. Stear, and K. C. Chang. Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles. *BMC Genomics* **4**: 8 (2003).

31. D. Avram, E. P. Romijn, E. H. Pap, A. J. Heck, and K. W. Wirtz. Identification of proteins in activated human neutrophils susceptible to tyrosyl radical attack. A proteomic study using a tyrosylating fluorophore. *Proteomics* **4**: 2397-407 (2004).

32. S. Hashimoto, T. Suzuki, H. Y. Dong, N. Yamazaki, and K. Matsushima. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. *Blood* **94**: 837-44 (1999).

33. Y. Wei, S. C. Miller, Y. Tsuji, S. V. Torti, and F. M. Torti. Interleukin 1 induces ferritin heavy chain in human muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **169**: 289-96 (1990).

34. J. L. Beard. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* **131**: 568S-579S; discussion 580S (2001).
35. R. J. Allcock, J. H. Williams, and P. Price. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. *Genes Cells* **6**: 487-94 (2001).
36. U. Zabel, T. Henkel, M. S. Silva, and P. A. Baeuerle. Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *Embo J* **12**: 201-11 (1993).
37. S. T. Lille, S. R. Lefler, A. Mowlavi, H. Suchy, E. M. Boyle, Jr., A. L. Farr, C. Y. Su, N. Frank, and D. C. Mulligan. Inhibition of the initial wave of NF-kappaB activity in rat muscle reduces ischemia/reperfusion injury. *Muscle Nerve* **24**: 534-41 (2001).

Table 1 : Patterns of genes mainly downregulated after an IM administration of Propylene glycol and its evolution at 5 post-injection time-intervals


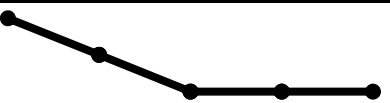
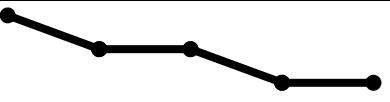



Id	Pattern					Function	Description
	0h	6h	48h	7d	21d		
39						Metabolism	Aldolase A (ALDOA), Creatine Kinase (CKM), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1), pyruvate kinase (PKM2), phosphoglycerate mutase 2 (PGAM2), phosphorylase glycogen- muscle (PYGM), Phosphofructokinase-like protein (PFKM-like), triosephosphate isomerase (TPI1)
						Mitochondrial metabolism	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (COX7A2), cytochrome c oxidase, subunit 8B pseudogene (COX8B), Citrate Synthase (CS), NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19kDa (NDUFA8)
						Structure / Contraction	Alpha-actin 1 (ACTA1), Actinin alpha 3 (ACTN3), MYRL2, Myosin binding protein C (MYBPC2), Myosin Heavy Chain 1 (MYH1), MYH3, MYH4, MYH7, MYH8, TNNC2, Myozenin 1(MYOZ1), Myozenin 3 (MYOZ3), Nebulin (NEB), tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), tropomyosin 2 (beta) (TPM2)
						Signal transduction	ATPase Ca++ transporting (ATP2A1)
						Transcription	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2 (CTDSP2)
36						Structure / Contraction	ACTN3
30						Metabolism	Enolase 3 (ENO3)
						Structure / Contraction	MYH8
48						Unknown	FKSG26
						Unknown	PRO2605: biomarker of breast cancer cell line
37						Metabolism	ALDOA, CKM, ENO3, lactate dehydrogenase B (LDHB), Phosphoglycerate mutase (PGAM2), PYGM
						Structure / Contraction	ACTA1, Myosin regulatory light chain 2 (MYRL2), Troponin C (TNNC2)
31						Metabolism	Aldolase A (ALDOA), ENO3, Creatine kinase M (CKM), (GAPD)
						Mitochondrial metabolism	Cytochrome c oxidase I (MTCO1)

Table 2: Patterns of genes mainly upregulated after an IM administration of Propylene glycol and its evolution at 5 post-injection time-intervals









Id	Pattern					Function	Description
	0h	6h	48h	7d	21d		
41						Metabolism	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1), synaptophysin-like protein (SYPL)
						Structure	actin beta (ACTB), Collagen type VI alpha 1(COL6A1)
						Signal transduction	Annexin A6 (ANXA6), Guanine nucleotide binding protein (GNB2), Heat shock 70kDa protein 1 (HSPA1A), glia maturation factor gamma (GMFG), ATPase Ca++ transporting plasma membrane 2 (ATP2B2), Nucleoprotein (TPR)
						Transcription	Glycyl-tRNA synthetase Purine (GARS)
						Proteolysis	BCL2-associated athanogene (BAG3), Carboxypeptidase D (CPD)
						Protein interaction	Ankyrin repeat domain 6 (ANKRD6, canonical Wnt and Wnt/JNK signaling)
						Inflammation	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1 (NFKBIL1), Lactotransferrin (LTF), Major seminal plasma glycoprotein (PSP1), Cyclophilin A (PPIA)
						Cellular proliferation	Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN), FYN oncogene related to SRC (FYN)
						Unknown	C6orf134, CTG0, KIAA0644, « Zn finger prot (FLJ31121) »
						Proteolysis, Structure, & Signal transduction	Tensin (TNS)
38						Protein synthesis	18S ribosomal subunit
						Protein interaction	Ankyrin repeat domain 2 (ANKRD2)
						Signal transduction	Ras-related associated with diabetes (RRAD), « Tax-6 »

Table 2 (continued)

43		Mitochondrial metabolism	MTCO3, ATP synthase H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex alpha subunit isoform 1 (ATP5A1)
		Protein synthesis	Ribosomal proteins L8, L11, L18, L19, L23, L28, S3, S5, S11, S15, S19, S26, translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)
		Intacellular proteolysis	Calpain small subunit 1 (CAPNS1), Legumain (LGMN)
		Molecular chaperones	Heat shock 90kDa protein 1 alpha-like 3 (HSPCAL3),
		Hormonal regulation	Follicle stimulating hormone beta polypeptide (FSHB)
		Inflammatory reaction	Beta-2 microglobulin (B2M), Thymosin beta-4 (TMSB4), HLA-B associated transcript 1 (BAT1), Cyclophilin B (PPIB), Ferritin heavy polypeptide (FTH), Ferritin light polypeptide (FLH),
		Cytoskeleton	Tubulin alpha 1 (TUBA1), Vimentin (VIM), Cofilin 1 (CFL1)
		Unknown	C20orf178 (synonyms: Shax1, CHMP4A, CHMP4B, dJ553F4.4)
52		Extracellular matrix	Collagen type 1 alpha 1 (COL1A1), Collagen type 1 alpha 2 (COL1A2), Fibronectin (FN)
34		Intermediate filament	Desmin (DES, myogenic marker)
49		Cell growth regulator	Osteonectin (SPARC), H19: imprinted maternally expressed untranslated mRNA
		Inflammation	Complement cytotoxicity inhibitor (CCI)
76		Extracellular matrix	Collagen type 1 alpha 2 (COL1A2)
67		Metabolism	Pyruvate kinase (PKM)
		Extracellular matrix	Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)

D. Discussion générale

Dans ce second volet expérimental, nous avons exploré les voies physiopathologiques qui avaient été suggérées principalement, lors des études de validation de méthodes, par l'observation des lésions (de nature inflammatoire) et l'évolution de la température cutanée au site d'injection (phénomènes hémodynamiques locaux).

Concernant l'inflammation, les COX n'avaient jamais été mises en évidence à notre connaissance dans le muscle squelettique. Nous avons choisi d'utiliser des conditions expérimentales les plus favorables pour détecter leur expression. Le modèle d'ischémie par tourniquet a été choisi car il permet l'induction d'une ischémie-reperfusion de manière homogène dans une large masse de muscles, ce qui a facilité les étapes de biologie moléculaire. De plus, l'inflammation lors d'ischémie-reperfusion musculaire a été fréquemment décrite dans la littérature. La durée de 2 heures choisie pour l'ischémie était suffisante pour induire une inflammation modérée mais réversible, à la manière d'une lésion au point d'injection, qui entraîne une dégénérescence suivie d'une régénération musculaire. L'inflammation et la lésion musculaire ont été correctement mises en évidence par l'œdème musculaire, maximal à 10 h de reperfusion, et la concentration d'activité CK plasmatique, très fortement augmentée dès la fin de l'ischémie. Nous avons ainsi pu mettre en évidence les 2 isoenzymes COX à des moments très précis du développement lésionnel. Les ARNm et les protéines COX-1 étaient présents à un niveau stable dans le muscle normal et le muscle atteint, suggérant un rôle de régulation de l'homéostasie musculaire pour COX-1, comme cela a été décrit dans de nombreux autres tissus. COX-1 peut aussi être impliquée dans la phase précoce de régénération musculaire puisqu'une augmentation tardive de l'expression des ARNm COX-1 a été montrée. Pourtant, aucune modification des niveaux d'expression protéique n'a été détectée : ce phénomène peut être lié à un manque de sensibilité de la détection des protéines COX-1, une faible augmentation d'expression étant masquée par le niveau basal, ou à une expression de COX-1 tronquée non fonctionnelle, ou encore à une régulation post-traductionnelle de COX-1. Au contraire de COX-1, une expression majeure de protéines COX-2 a été mise en évidence à 6 et 10 h de reperfusion, suggérant un rôle transitoire de COX-2 dans

l'inflammation musculaire induite par l'ischémie-reperfusion. Pourtant, comme observé précédemment dans le muscle squelettique (Bondesen *et al.*, 2004) ou dans la vessie (Wheeler *et al.*, 2001), aucune modification de l'expression des ARNm COX-2 n'a été vue ici, probablement en raison de leur extrême instabilité.

La protéine COX-2 est effectivement induite durant la phase de reperfusion aiguë. Il a été d'ailleurs récemment suggéré un rôle important de COX-2 durant les phases précoces de régénération musculaire (Bondesen *et al.*, 2004).

Dans notre étude d'hémodynamique menée chez le lapin, l'indométhacine (AINS mixte) a permis de réduire l'étendue des lésions aiguës, ce qui permet de confirmer l'implication fonctionnelle des COX (l'un ou l'autre isoenzyme) dans les premières heures au moins du développement des lésions musculaires iatrogènes. En phase de régénération des lésions musculaires iatrogènes, pourtant, aucune différence n'a été mise en évidence dans notre étude chez le rat entre les groupes recevant des AINS de sélectivité différente avant l'administration IM, ni sur le plan fonctionnel, ni dans l'étendue des lésions. Ces résultats suggèrent que les COX interviennent probablement dans l'inflammation locale initiale, mais ne déterminent pas l'étendue lésionnelle au long terme, c'est-à-dire celle qui est essentielle d'un point de vue économique. Le but de cette étude chez le rat était de visualiser des effets majeurs induits par l'inhibition des COX. L'induction de lésions musculaires plus marquées aurait peut-être permis la mise en évidence de différences entre les groupes traités, mais les volumes de PG à administrer auraient alors été trop importants pour être représentatifs de lésions musculaires iatrogènes. La température du site d'injection a été observée et est inférieure à la température du témoin controlatéral. Ceci peut être lié au développement d'un œdème musculaire qui a limité les conductions thermiques et contribué à la différence entre les 2 muscles.

Ce travail pourrait être poursuivi par l'étude de l'effet à court terme d'AINS de sélectivité différente, en testant la corrélation entre inflammation et étendue lésionnelle. Les prostanoïdes synthétisés par les COX dans la lésion pourraient également être suivis. En effet, des prostanoïdes anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires peuvent être produits à différents moments de l'évolution lésionnelle. Dans un modèle de pleurésie chez le rat, les prostanoïdes PGD₂, PGF_{2α} et 15deoxy_α¹²⁻¹⁴PGJ₂ sont produits à 48 h par COX-2 ou par une autre isoenzyme de cyclooxygénase, COX-3 (Willoughby *et al.*, 2000). Ils ne sont plus proinflammatoires,

comme PGE₂, mais ont des effets anti-inflammatoires (Gilroy *et al.*, 1999; Gilroy *et al.*, 1998).

L'étude de l'hémodynamique musculaire a démontré que la lésion iatrogène aiguë est le siège de contractions musculaires et d'une augmentation globale de la perfusion sanguine, observée de manière rapide et fugace après l'administration. Nos hypothèses étaient que les contractions pouvaient induire une hyperperfusion sanguine par augmentation de la demande énergétique, mais pouvaient aussi entraîner des tensions intramusculaires et des lésions mécaniques ou protéolytiques (Armstrong, 1990) des fibres. Comme de nombreuses études ont suggéré un rôle central de l'augmentation du calcium intracellulaire dans le développement de différents types de lésions musculaires (Armstrong, 1990; Brazeau et Fung, 1990; Schmidt et Schmidt, 1987), le rôle du calcium a aussi été évalué par l'utilisation de dantrolène, agent bloquant la libération du calcium par le reticulum sarcoplasmique (Paul-Pletzer *et al.*, 2001). Les prostanoïdes pro- ou anti-inflammatoires produits par les COX ayant des effets vasoactifs (Lash, 1996), leur implication hémodynamique et lésionnelle a aussi été étudiée par l'utilisation d'indométhacine, inhibiteur mixte de COX-1 et COX-2. Enfin, la participation d'une inflammation de type neurogénique a été testée par l'inhibition des récepteurs NK-1. En effet, l'inflammation neurogénique, à point de départ sensoriel, peut induire une vasodilatation artérielle majeure (Payan, 1992).

Les résultats ont montré que l'hyperhémie musculaire est réduite par l'inhibition pharmacologique des contractions musculaires, du calcium intracellulaire, de la voie des COX et de l'inflammation neurogénique. L'absence de contractions musculaires au cours de l'injection ne modifie pas l'étendue des lésions, mais les autres inhibiteurs pharmacologiques réduisent la lésion musculaire. Des inhibiteurs différents pouvant moduler la lésion sans totalement l'abolir, ceci montre que la variation de débit sanguin est une composante associée à la lésion mais non déterminante. Le développement de la lésion est donc un mécanisme complexe qui fait intervenir plusieurs facteurs ou plusieurs voies physiopathologiques.

La lésion musculaire iatrogène semble représenter un modèle de lésion original, voire unique par l'association de zones hypoperfusées à des zones hyperperfusées. Cette étude a été menée en phase aiguë sous anesthésie volatile étroitement contrôlée. Pour obtenir des informations hémodynamiques à plus long terme, il est

envisageable de développer chez le lapin un modèle d'étude plus chronique avec une répartition des 6 points de mesure de débits, mais avec une instrumentation plus difficile à maintenir chez l'animal vigile.

Le caractère multifactoriel de la physiopathologie des lésions musculaires iatrogènes nous a enfin suggéré la réalisation d'une étude de criblage du plus grand nombre de voies physiopathologiques possibles par l'analyse du transcriptome musculaire sans hypothèse physiopathologique formulée *a priori*. Au total, les variations d'expression de 1908 gènes ont été observées chez 10 porcelets entre 6 h, 2, 7 et 21 jours après l'administration IM. L'originalité du schéma expérimental est la comparaison dynamique du niveau d'expression des gènes sur le même animal entre deux stades lésionnels consécutifs. Ceci a limité la variabilité des résultats par rapport aux comparaisons inter-individuelles qui sont classiquement effectuées dans les études de génomique fonctionnelle. Cette approche a également permis le regroupement des gènes par leur profil d'évolution global entre les 5 stades lésionnels. De façon générale, les résultats montrent que l'expression des gènes impliqués dans la contraction musculaire et le métabolisme cellulaire et mitochondrial est d'emblée réprimée, alors que l'expression de gènes de la protéolyse est augmentée. Ces observations correspondent bien à la phase de dégénérescence tissulaire qui est notée macroscopiquement et en histologie, avec un ralentissement métabolique du tissu. D'autre part, l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines ribosomales, pour des précurseurs du collagène et pour des filaments intermédiaires est augmentée entre 6 h et 2 jours après l'induction de la lésion, montrant un début de régénération très précoce du tissu musculaire. Il est important de noter que cette approche a permis de mettre en évidence des processus physiopathologiques associés à la lésion, mais dont on ne sait s'ils sont impliqués comme causes ou comme conséquences de la lésion iatrogène.

CONCLUSION

1/ La méthode non invasive d'évaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes a été validée ici par rapport au volume lésionnel mesuré après prélèvement des sites d'injection. Cette méthode est donc fiable, et peut surtout permettre de tester plusieurs formulations à usage intramusculaire sur les mêmes animaux (ou chez l'homme). Ceci peut constituer pour les milieux professionnels (industrie du médicament, coopératives de production, etc...) un test rapide et quantitatif pour choisir les formulations les mieux tolérées.

Nous avons vu que l'échographie, malgré de bonnes qualités métrologiques intrinsèques n'est pas utilisable pour la mesure et le suivi des lésions musculaires iatrogènes.

Au cours de ces études d'évaluation quantitative des lésions, plusieurs hypothèses mécanistiques ont été formulées à partir de l'observation des lésions et de l'évolution de la température du site d'injection.

2/ Le second aspect de notre travail était de comprendre le développement des lésions musculaires iatrogènes afin de contribuer à l'amélioration des formulations à usage intramusculaire. Les hypothèses mécanistiques suggérées ont été alors testées. En phase de lésion aiguë, des variations importantes du débit sanguin musculaire ont été mises en évidence, avec des zones à perfusion augmentée, d'autres à perfusion diminuée. L'inflammation impliquant les COX, le calcium sarcoplasmique et l'inflammation neurogénique sont en partie responsables du développement des lésions en phase aiguë. Des variations d'expression de COX-1 et de COX-2 ont été montrées dans le muscle, ces isoenzymes de COX pouvant avoir un rôle difficile à déterminer, utile ou nuisible à la régénération musculaire. Ces observations ont été complétées par l'analyse globale du transcriptome musculaire à plusieurs stades lésionnels. L'expression de nombreux gènes a été modifiée par la lésion iatrogène et a été mise en relation avec les grandes phases de l'évolution histologique des lésions. Les variations d'expression les plus nombreuses ont été observées en phase lésionnelle aiguë, dans les 48 h après induction de la lésion iatrogène.

Les résultats que nous avons obtenus ne permettent pas d'identifier un mécanisme physiopathologique princeps, et donc de proposer d'emblée des perspectives pour mieux prédire et contrôler l'étendue lésionnelle suite à une administration IM. Au contraire, les très nombreux facteurs de variation de l'étendue lésionnelle documentés dans la synthèse bibliographique, et l'aspect multifactoriel des mécanismes mis en évidence par ce travail démontrent qu'il n'existe probablement pas de modalités simples de contrôle de la lésion iatrogène. Notre travail souligne aussi que la simple observation de l'expression d'un gène (ici COX) est une vision réductionniste de l'amplitude des perturbations au niveau du transcriptome, et en outre ne permet pas de prédire l'impact positif d'un traitement (ex : AINS). L'approche de criblage génomique en aveugle, c'est-à-dire sans hypothèse de travail, nous a permis d'identifier de nombreux gènes d'intérêt potentiel, mais avec la difficulté maintenant d'identifier les plus pertinents à étudier. Il est probable par conséquent que la recherche d'une solution pour limiter le développement lésionnel nécessitera encore de nombreux efforts et que l'évaluation *in vivo* (avec par exemple la cinétique de la concentration d'activité CK plasmatique) restera encore incontournable.

A défaut de solution simple et définitive aux lésions musculaires iatrogènes, il convient en premier lieu d'informer précisément le prescripteur sur la tolérance locale. Le risque entraîné par la lésion (pertes économiques, douleurs, etc...) doit alors être évalué conjointement au bénéfice associé à l'administration IM pour le patient (traitement).

REFERENCES

1. **Aktas M, Lefebvre HP, Toutain PL et Braun JP.** Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates. *J Vet Pharmacol Ther* 1995a, 18: 1-6.
2. **Aktas M, Vincclair P, Lefebvre HP, Toutain PL et Braun JP.** In vivo quantification of muscle damage in dogs after intramuscular administration of drugs. *Br Vet J* 1995b, 151: 189-196.
3. **al-Suwayeh SA, Tebbett IR, Wielbo D et Brazeau GA.** In vitro-in vivo myotoxicity of intramuscular liposomal formulations. *Pharm Res* 1996, 13: 1384-1388.
4. **Allémann E, Gurny R, Doelker E, Skinner FS et Schütz H.** Distribution, kinetics and elimination of radioactivity after intravenous and intramuscular injection of ¹⁴C-savoxepine loaded poly (D,L-lactic acid) nanospheres to rats. *J Control Release* 1994, 29: 97-104.
5. **Almekinders LC et Gilbert JA.** Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med* 1986, 14: 303-308.
6. **Alvarez EV, Munters M, Lavine LS, Manes H et Waxman J.** Quadriceps myofibrosis. A complication of intramuscular injections. *J Bone Joint Surg Am* 1980, 62: 58-60.
7. **Amelink GJ, Van der Kallen CJ, Wokke JH et Bar PR.** Dantrolene sodium diminishes exercise-induced muscle damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990, 179: 187-192.
8. **Andrews PV, Helme RD et Thomas KL.** NK-1 receptor mediation of neurogenic plasma extravasation in rat skin. *Br J Pharmacol* 1989, 97: 1232-1238.
9. **Anonyme.** Netherlands: Injection site damage to pig carcasses. *Animal Pharm* 1991: 4.
10. **Armstrong RB.** Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 1990, 22: 429-435.
11. **Autefage A, Fayolle P et Toutain PL.** Distribution of material injected intramuscularly in dogs. *Am J Vet Res* 1990, 51: 901-904.

12. **Babhulkar SS.** Triceps contracture caused by injections. A report of 11 cases. *J Bone Joint Surg Br* 1985, 67: 94-96.
13. **Bai Q, McGillivray C, da Costa N, Dornan S, Evans G, Stear MJ et Chang KC.** Development of a porcine skeletal muscle cDNA microarray: analysis of differential transcript expression in phenotypically distinct muscles. *BMC Genomics* 2003, 4: 8.
14. **Barlow Y et Willoughby J.** Pathophysiology of soft tissue repair. *Br Med Bull* 1992, 48: 698-711.
15. **Barrois F.** Terramycine Longue Action (T.L.A.). Mise à disposition des utilisateurs d'un dossier technique complet. *Bull Soc Vet Prat France* 1985, 69: 473-484.
16. **Beechinor JG, Buckley T et Bloomfield FJ.** Prevalence and public health significance of blemishes in cuts of Irish beef. *Vet Rec* 2001, 149: 43-44.
17. **Beecroft PC et Kongelbeck SR.** How safe are intramuscular injections? *AACN Clin Issues Crit Care Nurs* 1994, 5: 207-215.
18. **Beecroft PC et Redick S.** Possible complications of intramuscular injections on the pediatric unit. *Pediatr Nurs* 1989, 15: 333-336, 376.
19. **Beecroft PC et Redick SA.** Intramuscular injection practices of pediatric nurses: site selection. *Nurse Educ* 1990, 15: 23-28.
20. **Beneke R, Neuerburg J et Bohndorf K.** Muscle cross-section measurement by magnetic resonance imaging. *Eur J Appl Physiol* 1991, 63: 424-429.
21. **Benoit PW, Yagiela JA et Ferrell Fort N.** Pharmacologic correlation between local anesthetic-induced myotoxicity and disturbances of intracellular calcium distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980, 52: 187-198.
22. **Bergeson PS, Singer SA et Kaplan AM.** Intramuscular injections in children. *Pediatrics* 1982, 70: 944-948.
23. **Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Tagett R, Loriod B, Giaconia A, Benziane A, Devilard E, Jacquemier J, Viens P, Nguyen C, Birnbaum D et Houlgatte R.** Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival. *Hum Mol Genet* 2002, 11: 863-872.
24. **Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM et Pavlath GK.** The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, 287: C475-483.

25. **Bost F.** Les lésions au point d'injection : Une revue de la bibliographie. éditeur Upjohn Santé Animale, 1994a.
26. **Bost F.** Un point sur le problème de la tolérance locale des anti-infectieux. *Prospective (Laboratoire Upjohn Santé Animale)* 1994b, 1: 1-5.
27. **Boyd JS.** Selection of sites for intramuscular injections in the neck of the horse. *Vet Rec* 1987, 121: 197-200.
28. **Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ et Verrier ED.** Ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997, 64: S24-30.
29. **Braun U.** Ultrasonographic examination of the left kidney, the urinary bladder, and the urethra in cows. *Zentralbl Veterinarmed A* 1993, 40: 1-9.
30. **Braun U.** Ultrasonographic examination of the right kidney in cows. *Am J Vet Res* 1991, 52: 1933-1939.
31. **Braun U, Fohn J et Pusterla N.** Ultrasonographic examination of the ventral neck region in cows. *Am J Vet Res* 1994, 55: 14-21.
32. **Brazeau GA, Cooper B, Svetic KA, Smith CL et Gupta P.** Current perspectives on pain upon injection of drugs. *J Pharm Sci* 1998, 87: 667-677.
33. **Brazeau GA et Fung HL.** Mechanisms of creatine kinase release from isolated rat skeletal muscles damaged by propylene glycol and ethanol. *J Pharm Sci* 1990, 79: 393-397.
34. **Brazeau GA et Fung HL.** Physicochemical properties of binary organic cosolvent-water mixtures and their relationships to muscle damage following intramuscular injection. *J Parenter Sci Technol* 1989, 43: 144-149.
35. **Bree MM, Cohen BJ et Abrams GD.** Injection lesions following intramuscular administration of chlorpromazine in rabbits. *J Am Vet Med Assoc* 1971, 159: 1598-1602.
36. **Campbell WG, Gordon SE, Carlson CJ, Pattison JS, Hamilton MT et Booth FW.** Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 280: C763-768.
37. **Cauvin ER.** Musculoskeletal ultrasonography: Seeing is believing. *The Vet J* 1999, 158: 4-5.
38. **Chien GL, Anselone CG, Davis RF et Van Winkle DM.** Fluorescent vs. radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow. *Cardiovasc Res* 1995, 30: 405-412.

39. **Chiu SS, Mano J, Yukawa YN, Kumakura TK et Shoyama T.** Contracture of the quadriceps muscle caused by injection. *Acta Orthop Belg* 1975, 41: 306-315.
40. **de Laistre Banting A et Fanneau de la Horie GC.** Subcutaneous and intramuscular injection of oxytetracycline in calves: comparison of serum concentration and local tolerance. *J Vet Pharmacol Ther* 1987, 10: 184-186.
41. **Diness V.** Local tissue damage after intramuscular injections in rabbits and pigs: quantification by determination of creatine kinase activity at injection sites. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985, 56: 410-415.
42. **Doyle CA et Hunt SP.** Substance P receptor (neurokinin-1)-expressing neurons in lamina I of the spinal cord encode for the intensity of noxious stimulation: a c-Fos study in rat. *Neuroscience* 1999, 89: 17-28.
43. **Duncan CJ et Jackson MJ.** Different mechanisms mediate structural changes and intracellular enzyme efflux following damage to skeletal muscle. *J Cell Sci* 1987, 87 (Pt 1): 183-188.
44. **Eustice R.** Back to basics-Injection-site blemishes are still an issue. *The Bovine Practitioner* 1996: 11-14.
45. **FDA-ICH.** M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals. Dans: *Guidance for Industry*. éditeur U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 1997.
46. **Firth EC, Nouws JF, Driessens F, Schmaetz P, Peperkamp K et Klein WR.** Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicillin G in horses. *Am J Vet Res* 1986, 47: 2380-2384.
47. **FMRC.** *Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Regional Organ Perfusion*. University of Washington Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Seattle, WA, 1999
48. **Fornage BD, Touche DH, Segal P et Rifkin MD.** Ultrasonography in the evaluation of muscular trauma. *J Ultrasound Med* 1983, 2: 549-554.
49. **George MH, Heinrich PE, Dexter DR, Morgan JB, Odde KG, Glock RD, Tatum JD, Cowman GL et Smith GC.** Injection-site lesions in carcasses of cattle receiving injections at branding and at weaning. *J Anim Sci* 1995a, 73: 3235-3240.
50. **George MH, Morgan JB, Glock RD, Tatum JD, Schmidt GR, Sofos JN, Cowman GL et Smith GC.** Injection-site lesions: incidence, tissue histology, collagen concentration, and muscle tenderness in beef rounds. *J Anim Sci* 1995b, 73: 3510-3518.

51. **George MH, Tatum JD, Smith GC et Cowman GL.** Injection-site lesions in beef subprimals: incidence, palatability, consequences and economic impact. *Comp Contin Educ Pract Vet* 1997, 19: S84-93.
52. **Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Authier FJ, Laforet P, Belec L, Figarella-Branger D, Mussini JM, Pellissier JF et Fardeau M.** Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. Groupe d'Etudes et Recherche sur les Maladies Musculaires Acquises et Dysimmunitaires (GERMMAD) de l'Association Française contre les Myopathies (AFM). *Lancet* 1998, 352: 347-352.
53. **Gherardi RK, Coquet M, Cherin P, Belec L, Moretto P, Dreyfus PA, Pellissier JF, Chariot P et Authier FJ.** Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain* 2001, 124: 1821-1831.
54. **Gibaldi M et Perrier D.** *Pharmacokinetics*. Basel: Marcel Dekker, 1982.1,
55. **Gilles FH et French JH.** Postinjection sciatic nerve palsies in infants and children. *J Pediatr* 1961, 58: 195-204.
56. **Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ et Willoughby DA.** Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999, 5: 698-701.
57. **Gilroy DW, Tomlinson A et Willoughby DA.** Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 1998, 355: 211-217.
58. **Glenny RW, Bernard S et Brinkley M.** Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 1993, 74: 2585-2597.
59. **Glock R, Stanton T, Cheney J et Maxwell K.** Evaluation if tissue response to intramuscular injection of long-acting oxytetracycline. *Comp Contin Educ Pract Vet* 1995, 17: S31-S36.
60. **Greenblatt DJ et Allen MD.** Intramuscular injection-site complications. *J Am Med Assoc* 1978, 240: 542-544.
61. **Grounds MD.** Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Pathol Res Pract* 1991, 187: 1-22.
62. **Gutierrez JM, Arce V, Brenes F et Chaves F.** Changes in myofibrillar components after skeletal muscle necrosis induced by a myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Exp Mol Pathol* 1990, 52: 25-36.

63. **Hall-Craggs ECB.** Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol* 1974, 43: 349-358.
64. **Hall-Craggs ECB.** Survival of satellite cells following exposure to the local anesthetic bupivacaine (Marcaine). *Cell Tissue Res* 1980, 209: 131-135.
65. **Hamann GL, Egan TM, Wells BG et Grimmig JE.** Injection site reactions after intramuscular administration of haloperidol decanoate 100 mg/mL. *J Clin Psychiatry* 1990, 51: 502-504.
66. **Harris NR et Granger DN.** Ischemia/Reperfusion injury. Dans: *Organ procurement and preservation for transplantation*, publié par Toledo-Pereyra LH. Editeur: R. G. Landes co. 1997.
67. **Hassen A, Wilson DE, Wilham RL, Rouse GH et Trenkle AH.** Evaluation of ultrasound measurements of fat thickness and longissimus muscle area in feedlot cattle: Assessment of accuracy and repeatability. *Can J Anim Sci* 1998, 78: 277-285.
68. **Hay J.** Complications at site of injection of depot neuroleptics. *Br Med J* 1995, 311: 421.
69. **Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA et Stewart AG.** Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 2001, 424: 59-67.
70. **Herring WO, Kriese LA, K. BJ et J. C.** Comparison of four real-time ultrasound systems that predict intramuscular fat in beef cattle. *J Anim Sci* 1998, 76: 364-370.
71. **Hill LF.** Complication resulting from an intramuscular injection. *J Pediatr* 1967, 70: 1012-1013.
72. **Hogan Q, Dotson R, Erickson S, Kettler R et Hogan K.** Local anesthetic myotoxicity: A case and review. *Anesthesiol* 1994, 80: 942-947.
73. **Houpert P, Combrisson H, Le Nain S, Autefage A et Toutain PL.** Intra- vs intermuscular injections in swine. *Vet Res* 1993, 24: 278-285.
74. **Hsu H et Watanabe J.** The implication of thoracic duct lymph in the distribution and elimination of rabbit muscle creatine phosphokinase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1983, 31: 3269-3276.
75. **Hurme T, Kalimo H, Lehto M et Jarvinen M.** Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 1991, 23: 801-810.

76. **Iversen PO et Nicolaysen G.** Heterogeneous blood flow distribution within single skeletal muscles in the rabbit: role of vasomotion, sympathetic nerve activity and effect of vasodilation. *Acta Physiol Scand* 1989, 137: 125-133.
77. **Iversen PO, Standa M et Nicolaysen G.** Marked regional heterogeneity in blood flow within a single skeletal muscle at rest and during exercise hyperaemia in the rabbit. *Acta Physiol Scand* 1989, 136: 17-28.
78. **Kadir F, Eling WM, Abrahams D, Zuidema J et Crommelin DJ.** Tissue reaction after intramuscular injection of liposomes in mice. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992, 30: 374-382.
79. **Kearns SR, Moneley D, Murray P, Kelly C et Daly AF.** Oral vitamin C attenuates acute ischaemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *J Bone Joint Surg Br* 2001, 83: 1202-1206.
80. **Keller P.** Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage. *Res Vet Sci* 1974, 17: 49-58.
81. **Kern O.** Lokalverträglichkeit von Arznei- und Arzneihilfsstoffen bei intramuskulärer Injektion. *Tierärztl Umschau* 1987, 42: 768-775.
82. **Klenerman L, Lowe NM, Miller I, Fryer PR, Green CJ et Jackson MJ.** Dantrolene sodium protects against experimental ischemia and reperfusion damage to skeletal muscle. *Acta Orthop Scand* 1995, 66: 352-358.
83. **Kles V, Rio C et Poul JM.** Echographic method: interest for evaluation of local tolerance. *J Vet Pharmacol Ther* 1997, 20 (Suppl. 1): 127-128.
84. **Knirsch AK et Gralla EJ.** Abnormal serum transaminase levels after parenteral ampicillin and carbenicillin administration. *N Engl J Med* 1970, 282: 1081-1082.
85. **Korsrud GO, Boison JO, Papich MG, Yates WD, MacNeil JD, Janzen ED, Cohen RD, Landry DA, Lambert G, Yong MS et et al.** Depletion of intramuscularly and subcutaneously injected procaine penicillin G from tissues and plasma of yearling beef steers. *Can J Vet Res* 1993, 57: 223-230.
86. **Kyriakides C, Austen W, Jr., Wang Y, Favuzza J, Kobzik L, Moore FD, Jr. et Hechtman HB.** Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex. *Am J Physiol* 1999, 277: C1263-1268.
87. **Ladage CA, Walstijn TAv et Riessen HAv.** Comparative macroscopic evaluation of muscle damage in rats and in cattle after intramuscular administration of some commercially available injectable medicines. *Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology - Proceedings of the First European Congress on Veterinary Pharmacology and Toxicology* 1979, Zeist, The Netherlands. 34-40.

88. **Laduron P.** L'inflammation neurogénique. Dans: *L'inflammation*, publié par Russo-Marie F, Peltier A et Polla BS. Montrouge, France. Editeur: John Libbey Eurotext. 1998, p. 172-185.
89. **Lash JM.** Regulation of skeletal muscle blood flow during contractions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996, 211: 218-235.
90. **Lassourd V.** *Evaluation quantitative et non invasive de la tolérance locale de la phénylbutazone administrée par voie intramusculaire chez le cheval* 67. Toulouse: Ecole Nationale Vétérinaire - Université Paul Sabatier, 1995
91. **Lefebvre H.** *Evaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes par l'analyse pharmacocinétique de la libération de la créatine kinase* 224. Toulouse: Institut National Polytechnique, 1994
92. **Lefebvre HP, Jaeg JP, Rico AG, Toutain PL et Braun JP.** Variations of plasma creatine kinase in rabbits following repetitive blood sampling effects of pretreatment with acepromazine, carazolol and dantrolene. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992a, 30: 425-428.
93. **Lefebvre HP, Laroute V, Braun JP, Lassourd V et Toutain PL.** Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release. *Vet Res* 1996, 27: 343-361.
94. **Lefebvre HP, Rico AG, Toutain PL et Braun JP.** Détermination de l'activité de la créatine kinase dans les muscles et le plasma de lapin. *Revue de Médecine Vétérinaire* 1992b, 143: 273-275.
95. **Lefebvre HP, Toutain PL, Serthelon JP, Lassourd V, Gardey L et Braun JP.** Pharmacokinetic variables and bioavailability from muscle of creatine kinase in cattle. *Am J Vet Res* 1994, 55: 487-493.
96. **Lewis HB et Rhodes DC.** Effects of I.M. injections on serum creatine phosphokinase (CPK) values in dogs. *Vet Clin Pathol* 1978, 7: 11-13.
97. **Lopez F, Rougemont J, Loriod B, Bourgeois A, Loi L, Bertucci F, Hingamp P, Houlgatte R et Granjeaud S.** Feature extraction and signal processing for nylon DNA microarrays. *BMC Genomics* 2004, 5: 38.
98. **Losek JD et Gyuro J.** Pediatric intramuscular injections: do you know the procedure and complications? *Pediatr Emerg Care* 1992, 8: 79-81.
99. **Marshall AB et Palmer GH.** Injection sites and drug bioavailability. *Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology - Proceedings of the First European Congress on Veterinary Pharmacology and Toxicology* 1979, Zeist, The Netherlands. 54-60.

100. **Martineau G, Belayat F, Coignoul F, Martineau-Doize B, Josse M et Dewaele A.** Lésions musculaires chez le porc après injection de médicaments. *Ann Med Vet* 1980, 124: 215-222.
101. **Mastaglia FL.** Adverse effects of drugs on muscle. *Drugs* 1982, 24: 304-321.
102. **Mastaglia FL, Gardner-Medwin D et Hudgson P.** Muscle fibrosis and contractures in a pethidine addict. *Br Med J* 1971, 4: 532-533.
103. **Mawhinney H, Oakenfull SM et Nicholls TJ.** Residues from long-acting antimicrobial preparations in injection sites in cattle. *Aust Vet J* 1996, 74: 140-142.
104. **McArdle A, Edwards RH et Jackson MJ.** Release of creatine kinase and prostaglandin E2 from regenerating skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 1994, 76: 1274-1278.
105. **McIvor A, Paluzzi M et Meguid MM.** Intramuscular injection abscess--past lessons relearned. *N Engl J Med* 1991, 324: 1897-1898.
106. **Mishra DK, Friden J, Schmitz MC et Lieber RL.** Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *J Bone Joint Surg Am* 1995, 77: 1510-1519.
107. **Mottu F, Laurent A, Rufenacht DA et Doelker E.** Organic solvents for pharmaceutical parenterals and embolic liquids: a review of toxicity data. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000, 54: 456-469.
108. **Muller-Vahl H.** Adverse reactions after intramuscular injections. *Lancet* 1983, 1: 1050.
109. **Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM et Chan CC.** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 1999, 128: 853-859.
110. **Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H et Sugita H.** Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol (Berl)* 1983, 60: 167-174.
111. **Nosaka K et Sakamoto K.** Changes in plasma enzyme activity after intramuscular injection of bupivacaine into the human biceps brachii. *Acta Physiol Scand* 1999, 167: 259-265.
112. **Nouws JF.** Injection sites and withdrawal times. *Ann Rech Vet* 1990, 21 Suppl 1: 145S-150S.

113. **Nouws JF.** Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs. *Vet Q* 1984, 6: 80-84.
114. **Nouws JF, Smulders A et Rappalini M.** A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. *Vet Q* 1990, 12: 129-138.
115. **Nouws JFM.** Comparative plasma oxytetracycline levels of a "long-acting" and a normal oxytetracycline formulation in ruminant calves. *Second european congress of Veterinary Pharmacology and Toxicology* 1982, Toulouse, France. 195-198.
116. **Oshida S, Degawa K, Takahashi Y et Akaishi S.** Physico-chemical properties and local toxic effects of injectables. *Tohoku J Exp Med* 1979, 127: 301-316.
117. **Oukessou M, Uccelli-Thomas V et Toutain PL.** Pharmacokinetics and local tolerance of a long-acting oxytetracycline formulation in camels. *Am J Vet Res* 1992, 53: 1658-1662.
118. **Paul-Pletzer K, Palnitkar SS, Jimenez LS, Morimoto H et Parness J.** The skeletal muscle ryanodine receptor identified as a molecular target of [3H]azidodantrolene by photoaffinity labeling. *Biochemistry* 2001, 40: 531-542.
119. **Payan DG.** The role of neuropeptides in inflammation. Dans: *Inflammation: Basic principles and clinical correlates* (Second ed.), publié par Gallin JI, Goldstein IM et Snyderman R. New York. Editeur: Raven Press, Ltd. 1992, p. 177-192.
120. **Petzer IM, Giesecke WH et van Staden JJ.** A comparative investigation on the tissue compatibility in cattle of several oxytetracycline formulations for intramuscular administration. *XIII th World Congress on Disease of Cattle* 1984, Durban, september 17-21, 1984. 944-948.
121. **Poland GA, Borrud A, Jacobson RM, McDermott K, Wollan PC, Brakke D et Charboneau JW.** Determination of deltoid fat pad thickness. Implications for needle length in adult immunization. *J Am Med Assoc* 1997, 277: 1709-1711.
122. **Povey RC et Carman PS.** Technical basis of vaccination, Part 4: Routes of vaccination. Dans: *Veterinary vaccinology*, publié par Pastoret PP. Editeur: Elsevier Science. 1997, p. 525-528.
123. **Prinzen FW et Bassingthwaighe JB.** Blood flow distributions by microsphere deposition methods. *Cardiovasc Surg* 2000, 45: 13-21.
124. **Pyorala S, Laurila T, Lehtonen S, Leppa S et Kaartinen L.** Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole. *Acta Vet Scand* 1999, 40: 145-150.

125. **Pyorala S, Manner L, Kesti E et Sandholm M.** Local tissue damage in cows after intramuscular injections of eight antimicrobial agents. *Acta Vet Scand* 1994, 35: 107-110.
126. **Raab S, Thein E, Harris AG et Messmer K.** A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol* 1999, 276: H1801-1806.
127. **Rasmussen F.** Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs. *Vet Sci Comm* 1978: 173-182.
128. **Rasmussen F.** Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs in food-producing animals. *Trends in Veterinary Pharmacology and Toxicology - Proceedings of the First European Congress on Veterinary Pharmacology and Toxicology* 1979, Zeist, The Netherlands. 27-33.
129. **Rasmussen F et Svendsen O.** Tissue damage and concentration at the injection site after intramuscular injection of chemotherapeutics and vehicles in pigs. *Res Vet Sci* 1976, 20: 55-60.
130. **Roeber DL, Cannell RC, Belk KE, Scanga JA, Cowman GL et Smith GC.** Incidence of injection-site lesions in beef top sirloin butts. *J Anim Sci* 2001, 79: 2615-2618.
131. **Roeber DL, Cannell RC, Wailes WR, Belk KE, Scanga JA, Sofos JN, Cowman GL et Smith GC.** Frequencies of injection-site lesions in muscles from rounds of dairy and beef cow carcasses. *J Dairy Sci* 2002, 85: 532-536.
132. **Rossi L et Conen D.** [Intramuscular injections--an outdated form of administration? 6 cases of *Staphylococcus aureus* sepsis following intramuscular injections]. *Schweiz Med Wochenschr* 1995, 125: 1477-1482.
133. **Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, Gute DC et Korthuis RJ.** Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *J Appl Physiol* 1996, 80: 369-387.
134. **Schimmel C, Frazer D et Glenny RW.** Extending fluorescent microsphere methods for regional organ blood flow to 13 simultaneous colors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 280: H2496-2506.
135. **Schmidt E et Schmidt FW.** Enzyme release. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987, 25: 525-540.
136. **Smith WL, Garavito RM et DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996, 271: 33157-33160.

137. **Stella VJ, Lee HK et Thompson DO.** The effect of SBE4-CD on i.m. prednisolone pharmacokinetics and tissue damage in rabbits: Comparison to a co-solvent solution and a water-soluble prodrug. *Int J Pharm* 1995, 120: 197-204.
138. **Strock PE et Majno G.** Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 1969, 129: 309-318.
139. **Sudre K.** *Analyse du transcriptome du muscle bovin. Application à la recherche de marqueurs moléculaires des qualités de la viande* 149. Clermont-Ferrand: Université Blaise Pascal et Université d'Auvergne, 2003
140. **Sudre K, Leroux C, Pietu G, Cassar-Malek I, Petit E, Listrat A, Auffray C, Picard B, Martin P et Hocquette JF.** Transcriptome analysis of two bovine muscles during ontogenesis. *J Biochem (Tokyo)* 2003, 133: 745-756.
141. **Summan M, McKinstry M, Warren GL, Hulderman T, Mishra D, Brumbaugh K, Luster MI et Simeonova PP.** Inflammatory mediators and skeletal muscle injury: a DNA microarray analysis. *J Interferon Cytokine Res* 2003, 23: 237-245.
142. **Svendsen O.** Intramuscular injections and local muscle damage: an experimental study of the effect of injection speed. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1983a, 52: 305-309.
143. **Svendsen O.** Local muscle damage and oily vehicles: a study on local reactions in rabbits after intramuscular injection of neuroleptic drugs in aqueous or oily vehicles. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1983b, 52: 298-304.
144. **Svendsen O.** Local pain after slow and fast intramuscular injection of 0.9% sodium chloride in human volunteers. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1984, 55: 422-424.
145. **Svendsen O.** *Studies of tissue injuries caused by intramuscular injection of drugs and vehicles* Copenhagen, 1988
146. **Svendsen O et Aaes-Jorgensen T.** Studies on the fate of vegetable oil after intramuscular injection into experimental animals. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1979, 45: 352-378.
147. **Svendsen O et Blom L.** Intramuscular injections and muscle damage: effects of concentration, volume, injection speed and vehicle. *Arch Toxicol Suppl* 1984, 7: 472-475.
148. **Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F et Messmer K.** Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres. *Eur Surg Res* 2002, 34: 215-223.

149. **Thein E, Raab S, Harris AG et Messmer K.** Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput Methods Programs Biomed* 2000, 61: 11-21.
150. **Tidball JG.** Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1995, 27: 1022-1032.
151. **Tomlinson JE, Sage AM, Turner TA et Feeney DA.** Detailed ultrasonographic mapping of the pelvis in clinically normal horses and ponies. *Am J Vet Res* 2001, 62: 1768-1775.
152. **Toutain PL, Lassourd V, Costes G, Alvinerie M, Bret L, Lefebvre HP et Braun JP.** A non-invasive and quantitative method for the study of tissue injury caused by intramuscular injection of drugs in horses. *J Vet Pharmacol Ther* 1995, 18: 226-235.
153. **Turk R, 't Hoen PA, Sterrenburg E, de Menezes RX, de Meijer EJ, Boer JM, van Ommen GJ et den Dunnen JT.** Gene expression variation between mouse inbred strains. *BMC Genomics* 2004, 5: 57.
154. **Ustariz-Peyret C, Coudane J, Vert M, Kaltsatos V et Boisrame B.** Cephadrin-plaga microspheres for sustained delivery to cattle. *J Microencapsul* 1999, 16: 181-194.
155. **Vaccarino V, Sirtori CR et Bufalino L.** Local and systemic tolerability of piroxicam after intramuscular administration in healthy volunteers. *Curr Therap Res* 1989, 45: 1-13.
156. **Vachon P.** Self-mutilation in rabbits following intramuscular ketamine-xylazine-acepromazine injections. *Can Vet J* 1999, 40: 581-582.
157. **Van Alstine WG et Dietrich JA.** Porcine sciatic nerve damage after intramuscular injection. *Comp Contin Educ Pract Vet* 1988, 10: 1329-1332.
158. **van de Wijdeven GG.** Development and assessment of mini projectiles as drug carriers. *J Control Release* 2002, 85: 145-162.
159. **Van Donkersgoed J, Dixon S, Brand G et VanderKop M.** A survey of injection site lesions in fed cattle in Canada. *Can Vet J* 1997, 38: 767-772.
160. **Van Donkersgoed J, Dixon S et VanderKop M.** Injection site survey in Canadian-fed cattle: spring 1997. *Can Vet J* 1998, 39: 97-99.
161. **Van Donkersgoed J, Dubeski PL, VanderKop M, Aalhus JL, Bygrove S et Starr WN.** The effect of animal health products on the formation of injection site lesions in subprimals of experimentally injected beef calves. *Can Vet J* 2000, 41: 617-622.

162. **Van Donkersgoed J, VanderKop M, Salisbury C, Sears L et Holowath J.** The effect of administering long-acting oxytetracycline and tilmicosin either by dart gun or by hand on injection site lesions and drug residues in beef cattle. *Can Vet J* 1999, 40: 583-587.
163. **Vandenburgh HH, Hatfaludy S, Karlisch P et Shansky J.** Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture. *Am J Physiol* 1989, 256: C674-682.
164. **Vandenburgh HH, Shansky J, Karlisch P et Solerssi RL.** Mechanical stimulation of skeletal muscle generates lipid-related second messengers by phospholipase activation. *J Cell Physiol* 1993, 155: 63-71.
165. **Vandenburgh HH, Shansky J, Solerssi R et Chromiak J.** Mechanical stimulation of skeletal muscle increases prostaglandin F2 alpha production, cyclooxygenase activity, and cell growth by a pertussis toxin sensitive mechanism. *J Cell Physiol* 1995, 163: 285-294.
166. **Vane JR.** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971, 231: 232-235.
167. **Vannier P.** Immunisation des porcs charcutiers contre la maladie d'Aujeszky avec deux vaccins à adjuvants huileux. Etude des réactions locales. *Rec Med Vet* 1986, 162: 37-44.
168. **Ventura-Clapier R.** Créatine kinases et transferts d'énergie dans le myocyte cardiaque. *Medecine/Sciences* 1998: 1017-1024.
169. **Verlinde V, Mikaelian I, Laurentie M, Sanders P et Poul JM.** [Bioavailability of muscle creatine kinase in sheep. Application to the assessment of local tolerance to injectable veterinary formulations]. *Vet Res* 1996, 27: 133-146.
170. **Wallace JL.** Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 1999, 107: 11S-16S; discussion 16S-17S.
171. **Ward A, Chaffman MO et Sorkin EM.** Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs* 1986, 32: 130-168.
172. **Weiss SJ.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989, 320: 365-376.
173. **Wheeler MA, Yoon JH, Olsson LE et Weiss RM.** Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E(2) production are up-regulated in a rat bladder inflammation model. *Eur J Pharmacol* 2001, 417: 239-248.

Références

174. **Willoughby DA, Moore AR et Colville-Nash PR.** COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000, 355: 646-648.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. LES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES : ETAT DES LIEUX	14
A. GENERALITES	14
1. <i>Problématique : Les voies d'administration des médicaments</i>	14
a) La voie orale	14
b) Les voies parentérales injectables classiques (IM, SC, IV)	15
2. <i>Aspects économiques</i>	17
a) Amérique du Nord	17
b) Europe	20
c) Conséquences sur les propriétés organoleptiques de la viande	23
d) Influence des pratiques vétérinaires et zootechniques :	23
3. <i>Aspects éthiques</i>	25
a) Prévalence chez l'homme	25
b) Aspects cliniques	26
(1) Contractures musculaires	27
(2) Lésions nerveuses	27
(3) Abscesses et septicémies	28
(4) Myofasciite à macrophages	28
4. <i>Aspects pharmacocinétiques et efficacité</i>	29
5. <i>Recommandations techniques</i>	33
(1) Chez l'animal	33
(2) Chez l'homme	34
(a) Site d'injection	34
(b) Formulations à écarter	37
(c) Administrations répétées	37
(d) Longueur de l'aiguille	40
(e) Patients en soins intensifs	40
B. FACTEURS LESIONNELS IDENTIFIES	41
1. <i>Effet du principe actif</i>	41
a) Anti-inflammatoires	41
b) Antibiotiques	42
c) Anesthésiques locaux	42
2. <i>Effet de la concentration et du volume</i>	43
3. <i>Effet de l'excipient</i>	43
4. <i>Formulations innovantes</i>	45
5. <i>Voie d'administration: Intramusculaire sous-cutanée</i>	46
6. <i>Effet de la technique d'injection</i>	47
7. <i>Effet de la vitesse d'injection</i>	48

Table des matières

8.	<i>Effet du site d'injection</i>	49
9.	<i>Effet de l'espèce animale</i>	50
10.	<i>Effet de l'âge des animaux</i>	50
II.	METHODES D'EVALUATION DES LESIONS	51
A.	METHODE ANATOMO-PATHOLOGIQUE	52
B.	IMAGERIE MEDICALE	54
C.	EVALUATION DES LESIONS MUSCULAIRES PAR DES MARQUEURS CIRCULANTS	55
1.	<i>Principe</i>	55
2.	<i>Utilisation de la CK dans l'évaluation des lésions musculaires d'origine iatrogène</i>	55
a)	Approches décrites	56
b)	Analyse pharmacocinétique	57
c)	Précautions	60
III.	ASPECTS MECANISTIQUES DU DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	61
A.	DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	61
1.	<i>Description d'une lésion musculaire iatrogène</i>	61
2.	<i>Mécanismes inflammatoires de lésion tissulaire</i>	63
a)	Définition de l'inflammation	63
b)	Cyclooxygénases et prostanoides	67
(1)	Intervention dans la réaction inflammatoire	67
(2)	Intervention des cyclooxygénases dans le muscle	67
c)	Inflammation neurogénique	71
(1)	Description de l'inflammation neurogénique	71
(2)	Modulation de l'inflammation neurogénique	72
3.	<i>Le phénomène d'ischémie-reperfusion musculaire</i>	73
a)	Aspect mécanistique général	73
b)	Syndrome des loges musculaires	74
4.	<i>Rôle du calcium intracellulaire</i>	76
5.	<i>Evolution chronique : régénération musculaire</i>	78
B.	METHODES EXPERIMENTALES	78
1.	<i>Etude de la perfusion musculaire</i>	79
2.	<i>Génomique fonctionnelle</i>	81
a)	Généralités	81
b)	Méthodes d'étude du transcriptome	82
c)	Transcriptome du muscle strié squelettique	84
(1)	Phénotype musculaire	84
(2)	Qualité de la viande	85
(3)	Pathologies musculaires	85

ETUDE EXPERIMENTALE	87
OBJECTIFS	87
I. DETECTION ET EVALUATION QUANTITATIVE DES LESIONS MUSCULAIRES IATROGENES	87
A. ETUDE 1 - VALIDATION DES METHODES DE QUANTIFICATION DES LESIONS (ARTICLE 1)	88
B. ETUDE 2 - APPLICATION ET CONSEQUENCE PHARMACOCINETIQUE (ARTICLE 2)	112
C. DISCUSSION GENERALE	139
1. <i>Echographie</i>	139
2. <i>Analyse pharmacocinétique de la CK</i>	140
3. <i>Hypothèses physiopathologiques</i>	141
II. MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DU DEVELOPPEMENT DES LESIONS MUSCULAIRES D'ORIGINE IATROGENE	143
MODELE EXPERIMENTAL	143
A. ETUDE DE L'INFLAMMATION MUSCULAIRE : VOIE DES CYCLOOXYGENASES	143
1. <i>Etude 1 - Mise en évidence des COX dans le muscle strié squelettique (Article 3)</i>	143
2. <i>Etude 2 - Conséquences lésionnelles, rôle des COX dans la régénération des lésions musculaires iatrogènes (non publié)</i>	166
B. ETUDE DES DEBITS SANGUINS MUSCULAIRES	169
1. <i>Etude 1 - Mise au point méthodologique (non publié)</i>	169
2. <i>Etude 2 - Etude principale (Article 4)</i>	170
C. ETUDE DU TRANSCRIPTOME MUSCULAIRE (ARTICLE 5)	183
D. DISCUSSION GENERALE	206
CONCLUSION	210

Pierre Ferré – 2004 – Etude des lésions musculaires iatrogènes: Méthodes non invasives d'évaluation quantitative et mécanismes physiopathologiques

RESUME

Malgré de nombreux avantages, l'administration intramusculaire entraîne fréquemment la formation de lésions au site d'injection. L'évaluation quantitative des lésions par l'analyse pharmacocinétique de la créatine kinase a été validée chez l'ovin. Pourtant fiable pour la mesure du muscle intact, l'échographie n'est pas utilisable pour quantifier les lésions. L'évolution de la température cutanée chez l'ovin ayant suggéré l'intervention d'ischémie-reperfusion, l'activation des cyclooxygénases 1 et 2 a été évaluée dans un modèle de tourniquet chez le rat. L'étude de l'hémodynamique du site d'injection chez le lapin a montré une coexistence d'hypoperfusion centrale et d'hyperperfusion périphérique, avec intervention dans le développement de la lésion des cyclooxygénases, du calcium et de l'inflammation neurogénique. Enfin, l'étude du transcriptome musculaire par microréseau chez le porc a mis en évidence 187 gènes à expression modifiée à 6 h, 2, 7 ou 21 jours après induction de la lésion.

SUMMARY

Despite several advantages, the intramuscular (IM) route frequently induces injection site muscle damage. The non-invasive quantitation of muscle damage by pharmacokinetic analysis of plasma creatine kinase was validated here. Although a valuable tool in measuring intact muscle, ultrasonography was not precise enough for the assessment of muscle damage. The evolution of the cutaneous temperature in ovine suggesting the intervention of an ischemia-reperfusion phenomenon, the activation of cyclooxygenases 1 & 2 was investigated in a rat hindlimb tourniquet. A spatial heterogeneity in muscle blood flow was observed after an IM administration in the rabbit, with a hypoperfused central area surrounded by a peripheric area strongly hyperperfused, and neurogenic inflammation, cyclooxygenases and calcium were shown to be involved. Finally, a muscle transcriptome analysis in pig using a nylon microarray showed 187 modified gene expression at 6 h, 2, 7 or 21 days after an IM administration.